



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

**Reducción de fangos procedentes de las EDARs y
producción de materia grasa a partir del cultivo de
*Caenorhabditis elegans***

Carlos López Viso

Tesis Doctoral



Dirigida por Manuel Muñoz y Gassan Hodaifa
(Sevilla, 2017)



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería

Bioquímica

Reducción de fangos procedentes de las EDARs y producción de materia grasa a partir del cultivo de *Caenorhabditis elegans*

Tesis Doctoral

Carlos López Viso

Sevilla, 2017

Los Dres. MANUEL JESÚS MUÑOZ RUIZ y GASSAN HODAIFA MERI,
profesores titulares del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería
Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo sobre “Reducción de fangos
procedentes de las EDARs y producción de materia grasa a partir del cultivo de
Caenorhabditis elegans” ha sido realizado en los laboratorios de dicho
Departamento por el Licenciado D. Carlos López Viso, bajo nuestra dirección y
supervisión, reuniendo los requisitos de originalidad y calidad científica para
optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla; dentro
del Programa de Doctorado “Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química”.

Sevilla, Julio de 2017

LOS DIRECTORES DE LA MEMORIA

Fdo.: Gassan Hodaifa Meri

Fdo.: Manuel Muñoz Ruiz

Trabajo presentado por Carlos López Viso para optar al Grado
de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla .

Sevilla, Julio de 2017

Fdo.: Carlos López Viso

RESUMEN

En las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) se lleva a cabo el proceso de depuración para obtener un efluente cuyas características permitan su vertido a cauces públicos, como ríos o mares, sin que ello constituya un impacto ambiental apreciable. Normalmente, este proceso está constituido por dos líneas: la línea de agua y la línea de fango o sólidos. En la línea de fango, durante el proceso, se generan toneladas del mismo. Una parte de éste se trata mediante una digestión anaerobia para su estabilización, donde se elimina parcialmente la materia orgánica. Los fangos no estabilizados generan malos olores y pueden provocar riesgo contra la salud pública. Actualmente, los procesos de gestión y evacuación de los fangos, además de conllevar elevados costes ambientales y económicos, no son capaces de eliminar la totalidad de dicho residuo por lo que la reducción de su volumen es de gran importancia para las EDARs y el medio ambiente. En este trabajo de investigación, se propone un novedoso proceso basado en el cultivo del nematodo *Caenorhabditis elegans*, que permite digerir a compuestos más simples y reducir las cantidades de fango generado. A su vez, la biomasa resultante (fango + nematodo) contiene materia grasa como un subproducto de gran interés económico. Cabe destacar que *C. elegans* es un organismo modelo muy utilizado como herramienta de estudio en el campo de la biomedicina; sin embargo, esta sería la primera aplicación industrial descrita para este nematodo de vida libre.

Por tanto, se ha estudiado la viabilidad técnica del proceso propuesto y la influencia de diversos parámetros de operación en la cinética del crecimiento del nematodo y de la degradación del fango. Para ello, se ha cultivado el nematodo en placas de agar, matraces en orbital rotatorio y biorreactores de 1 L de capacidad útil. Los resultados obtenidos muestran que *C. elegans* es capaz de crecer alimentándose, exclusivamente, de fango como fuente de carbono. Además, se han realizado tres series experimentales en biorreactores manteniendo constantes todos los parámetros de operación excepto el correspondiente a cada serie: concentración inicial de fango, velocidad de suministro de aire y velocidad de agitación mecánica.

Desde el punto de vista de la cinética del crecimiento, estas series han permitido determinar parámetros característicos como son la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m), la productividad en biomasa (P) y la velocidad específica máxima de muerte (μ_d) cuyos valores máximos obtenidos han sido $0,0827\text{ h}^{-1}$, $1,924\text{ nem}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y $-0,0397\text{ h}^{-1}$, respectivamente. A partir de los resultados experimentales obtenidos se han aplicado diferentes modelos matemáticos que han establecido la relación entre los parámetros cinéticos calculados y las variables de operación estudiadas en el biorreactor.

En las series experimentales desarrolladas en los biorreactores también se ha abordado la cinética de degradación del fango durante el cultivo de *C. elegans*, pudiendo distinguir tres fracciones: efluente global, agua tratada y biomasa (fango + nematodos). El estudio del comportamiento del fango durante los cultivos de *C. elegans*, se ha llevado a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: carbono total, carbono orgánico total, carbono inorgánico, nitrógeno total y nitratos y nitritos (CT, COT, CI, NT y NN). Este estudio ha permitido calcular constantes de degradación, porcentajes de eliminación y rendimientos en las tres fracciones mencionadas. Los porcentajes máximos de reducción de materia orgánica, obtenidos en base al COT, han sido del 40,2% y el 73,1% para el efluente global y el agua tratada, respectivamente. También, se ha descrito la actividad nitrificante/desnitrificante del sistema.

En consecuencia, se ha realizado una evaluación económica para estudiar la viabilidad del proceso a nivel industrial, basada en la materia grasa generada a partir del nematodo y el fango, cuya extracción podría proporcionar un subproducto de interés industrial para la producción de biodiésel, lubricantes o bioplásticos. Se ha determinado que entre el 5 y el 11% del peso seco del nematodo es materia grasa. Además, la biomasa extractada se puede transferir a posteriori al proceso de digestión anaerobia con el objetivo de generar gas metano y estabilizar el fango final.

En conclusión, este trabajo ha permitido describir el funcionamiento del sistema “fango + nematodo” así como determinar las condiciones óptimas para el cultivo de *C. elegans* en biorreactores, desde el punto de vista de la cinética del crecimiento, la degradación del fango y el contenido en materia grasa.

Finalmente, el bioproceso propuesto en este trabajo de investigación constituye un nuevo subproceso que podría ser integrado en el tratamiento de las aguas residuales urbanas en las EDARS del futuro.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS	13
 <i>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</i>	 19
I.1. Tratamiento de aguas residuales	21
I.1.1. Agua residual y situación actual de las EDARs	21
I.1.2. Composición de las aguas residuales	24
I.1.3. Legislación actual sobre el tratamiento de aguas residuales y la evacuación de fangos	26
I.1.4. Tratamiento convencional de aguas residuales	28
I.1.4.1. Tratamiento primario	29
I.1.4.2. Tratamiento secundario	30
I.1.4.3. Tratamiento terciario	38
I.1.5. Línea de fangos	39
I.1.5.1. Composición y origen de los fangos	39
I.1.5.2. Gestión y tratamiento general para la reducción del fango en las EDARs	44
 I.2. Alternativas para reducción de fango	 48
I.2.1. Tratamientos térmicos	48
I.2.2. Tratamientos físico-químicos	50
I.2.3. Tratamientos biológicos	51
 I.3. Eco-manipulación con depredadores	 56
I.3.1. Antecedentes de utilización de depredadores	56
I.3.2. Depredación con oligoquetos	58
 I.4. El nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	 65
I.4.1. Definición y clasificación	65
I.4.2. <i>C. elegans</i> como organismo modelo	65
I.4.3. Contenido de materia grasa	69
 I.5. Posibles aplicaciones industriales del nematodo <i>C. elegans</i>	 71
I.5.1. Producción de biomasa	71
I.5.2. Producción de materia grasa	71
I.5.2.1. Biodiésel	72

I.6. Cinética	74
I.6.1. Cinética y orden de las reacciones químicas	74
I.6.2. Cinética del crecimiento	75
I.6.2.1. Velocidad específica máxima de crecimiento	75
I.6.2.2. Productividad de la biomasa de nematodos	76
I.6.2.3. Velocidad específica máxima de muerte	33
I.6.3. Modelos cinéticos	78
I.6.3.1. Modelo cinético de Monod	78
I.6.3.2. Inhibición por sustrato o producto (Modelo de Tessier)	79
 CAPÍTULO II. OBJETIVOS	 81
 CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	 85
III.1. Material biológico	87
III.1.1. Estirpes de <i>C. elegans</i> y <i>E. coli</i>	87
III.1.2. Fango	88
 III.2. Cultivo de <i>C. elegans</i>	 89
III.2.1. Cultivo estándar y mantenimiento en <i>E. coli</i>	89
III.2.1.1. Placas de agar con NGM	89
III.2.1.2. Matraces en orbital rotatorio con S-Medio	91
III.2.1.3. Separación por gradiente de sacarosa	94
III.2.1.4. Solución M9	94
III.2.2. Cultivo en fango	95
III.2.2.1. Preinóculos	95
III.2.2.2. Medio sólido en placas de agar	95
III.2.2.3. Medio líquido	97
A) Matraces en orbital rotatorio	97
B) Biorreactores	99
B.1) Instalación	99
B.2) Cultivo	102
 III.3. Caracterización del fango y seguimiento de los cultivos	 105
III.3.1. Sólidos totales, materia orgánica, cenizas y humedad	105
III.3.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	107
III.3.3. CT, COT, CI, NT, NKT y NN	112
III.3.4. Densidad	113
III.3.5. Conductividad, pH y concentración de oxígeno	114
III.3.6. Metales pesados	114

IV.2.2. Cultivo en matraces en orbital rotatorio.....	146
IV.2.2.1. Efecto de la variación del fango recogido de la EDAR en diferentes fechas en el crecimiento del nematodo.....	146
IV.2.2.2. Influencia de la concentración inicial de fango.....	147
IV.2.2.3. Efecto del almacenamiento del fango.....	149
IV.2.2.4. Influencia del inóculo inicial.....	159
IV.2.2.5. Efecto de los antiespumantes.....	151
IV.2.2.6. Reducción de fango.....	151
IV.2.2.7. Efecto de la adición de nutrientes de enriquecimiento.....	152
IV.2.3. Cultivo en biorreactor tanque agitado.....	155
IV.2.3.1. Estudio de la viabilidad del nematodo en biorreactores.....	155
IV.2.3.2. Estudio de algunas condiciones de operación en biorreactores.....	157
A) Efecto de la concentración de sustrato.....	158
B) Efecto del nivel de aireación.....	171
C) Influencia de la agitación mecánica.....	184
 IV.3. Lípidos totales y perfil de ácidos grasos.....	 199
 IV.4. Efecto de pretratamientos del fango en la población de nematodos.....	 201
 CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	 203
 V.1. Composición físico-química de los fangos de EDAR y elección del fango para el cultivo de <i>C. elegans</i>	 205
 V.2. Crecimiento de <i>C. elegans</i> en fango del espesador secundario.....	 209
V.2.1. Cultivos en medio sólido.....	209
V.2.2. Cultivos en medio líquido.....	211
V.2.2.1. Relaciones peso seco, CT, COT, CI, NT y N° de nematodos.....	211
V.2.2.2. Efecto de la variación del fango durante el año en el crecimiento del nematodo.....	213
V.2.2.3. Influencia de la concentración inicial del fango.....	214
V.2.2.4. Efecto del almacenamiento del fango.....	216
V.2.2.5. Influencia del inóculo inicial.....	217
V.2.2.6. Reducción de espuma.....	219
V.2.2.7. Reducción de fango.....	221
V.2.2.8. Efecto del enriquecimiento de los medios de cultivos.....	222

V.2.3. Biorreactores tanque agitado	227
V.2.3.1. Adaptación y crecimiento del nematodo en Biorreactores	227
V.2.3.2. Cinética del crecimiento de <i>C. elegans</i>	228
A) Efecto de la concentración inicial del fango	229
B) Influencia de la velocidad de suministro de aire	233
C) Efecto de la velocidad de agitación mecánica	237
V.2.3.3. Degradación del fango	240
A) Efecto de la concentración inicial del fango	241
B) Influencia de la velocidad de suministro de aire	269
C) Efecto de la velocidad de agitación mecánica	284
V.2.3.4. Reducción global en la materia orgánica del fango	300
V.3. Producción de materia grasa	302
V.4. Diseño propuesto del proceso a nivel industrial	307
V.4.1. Diagrama de flujo del proceso propuesto	307
V.4.2. Evaluación económica	310
V.5. Mejoras y posibles estudios futuros	314
V.5.1. Utilización directa del fango de recirculación biológica	314
V.5.2. Efecto de pretratamientos del fango en la población de nematodos	315
<u>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES</u>	317
BIBLIOGRAFÍA	323
AGRADECIMIENTOS	

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
b.s	Base seca
b.h	Base húmeda
CCE	Comisión del Consejo Europeo
CE	Conductividad Eléctrica
CEE	Comunidad Económica Europea
CGC	Centro Genético de Caenorhabditis (del inglés “Caenorhabditis Genetics Center”)
CI	Carbono Inorgánico
COT	Carbono Orgánico Total
COT_{elim}	Carbono Orgánico Total eliminado
COV	Compuesto Orgánico Volátil
CT	Carbono Total
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO₅	Demanda Biológica de Oxígeno
DS	Desviación Estándar
EPA	Agencia Estadounidense para la Protección del Medio Ambiente
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
FAC	Fango Activo Convencional

K_{COT, B}	Constante de degradación del carbono orgánico total en la biomasa total
K_{COT, EG}	Constante de degradación del carbono orgánico total en el efluente global
K_{COT, S}	Constante de degradación del carbono orgánico total en el agua tratada
K_i	Constante de inhibición (Modelo de Tessier)
K_{NN, EG}	Constante de degradación de nitratos y nitritos en el efluente global
K_{NN, S}	Constante de degradación de nitratos y nitritos en el agua tratada
K_{NT, B}	Constante de degradación del nitrógeno total en la biomasa
K_{NT, EG}	Constante de degradación del nitrógeno total en el efluente global
K_{NT, S}	Constante de degradación del nitrógeno total en el agua tratada
K_S	Constante de saturación (modelo de Monod y modelo de Tessier)
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MBR	Reactores biológicos de membrana
M.O	Materia orgánica (equivalente a SV)
Nem	Nematodos
NGM	Medio de crecimiento de nematodos (“Nematode Growth Medium”)
NKT	Nitrógeno Kjeldahl Total
NN	Nitratos y Nitritos
NT	Nitrógeno Total
NT_{elim}	Nitrógeno Total eliminado
OD	Oxígeno Disuelto
OPEC	Del inglés “Organization of the Petroleum Exporting Countries”
OSA	Del inglés “Oxic-Settling-Anaerobic”
P	Productividad (nematodos ml ⁻¹ h ⁻¹)
PNIR	Plan Nacional Integrado de Residuos

PNLD	Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales
Q	Caudal de aireación (L/min)
RBS	Reactores Biológicos Secuenciales
ρ	Densidad (g/ml)
RCTA	Reactor Continuo de Tanque Agitado
SRT	Tiempo de Residencia de sólidos (del inglés “Solids Retention Time”)
SSNV	Sólidos en Suspensión No Volátiles
SSQ	Sumatorio de los cuadrados de los residuos
SST	Sólidos en Suspensión Totales
SSV	Sólidos en Suspensión Volátiles
SNV	Sólidos No Volátiles (cenizas)
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles (materia orgánica)
SVI	Índice de Volumen del Fango
T	Temperatura
t	Tiempo
μ_D	Velocidad específica de muerte del nematodo (h^{-1})
$\mu_{D, \text{máx}}$	Velocidad específica de muerte máxima del nematodo (h^{-1})
μ_m	Velocidad específica de crecimiento del nematodo (h^{-1})
$\mu_{m, \text{máx}}$	Velocidad específica de crecimiento máxima del nematodo (h^{-1})
V	Volumen
$Y_{COTs/COTB}$	Rendimiento de degradación de la materia orgánica en función del carbono orgánico total en la fase líquida respecto al incremento/reducción del carbono orgánico total en la biomasa global
$Y_{NTB/COTB}$	Rendimiento del nitrógeno total incorporado/liberado a la biomasa respecto a la biomasa global generada calculada en base al COT

CAPÍTULO I. Introducción

I.1. Tratamiento de aguas residuales

I.1.1. Agua residual y situación actual de las EDARs

El agua es fundamental para el desarrollo de los seres vivos. De hecho, no se concibe la existencia de vida sin este elemento. Por su parte, la actividad humana tiene efectos drásticos sobre este recurso por lo que su adecuada gestión es de crucial importancia para los seres vivos y el medio ambiente. Las principales causas de la sobreexplotación de los recursos hídricos son el crecimiento demográfico y el desarrollo industrial y urbano. De hecho, la población humana se ha multiplicado dos veces y media desde 1950 hasta la actualidad (Crossette, 2011).

Históricamente, la captación y drenaje de aguas pluviales se remontan a tiempos antiguos; existen registros de la utilización de canalizaciones de desagüe en el Imperio Romano y la Antigua Grecia. Por otra parte, la actividad humana genera agua residual que contiene materia orgánica y otros contaminantes que impiden su reutilización directa para consumo o regadío. Sin embargo, la recogida de estas aguas residuales no se realiza hasta los inicios del siglo XIX y su tratamiento sistemático se produce a partir del siglo XX. En la segunda mitad del siglo XIX, se postula la teoría del germen de Koch y Pasteur que es considerada como un punto de inflexión en el saneamiento. De hecho, hasta el momento no existía una clara relación entre contaminación y enfermedades. Algunos ejemplos de estas enfermedades causantes de grandes epidemias que mermaron la población humana debido a una mala gestión de las aguas residuales fueron la legionelosis o el cólera; producidas por las bacterias *Legionella pneumophila* y *Vibrio cholerae*, respectivamente (Metcalf y Eddy, 2000).

Actualmente, el tratamiento de las aguas residuales se lleva a cabo en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales denominadas como “EDARs”. El objetivo de las EDARs es la gestión de este residuo con el fin de proteger el medio ambiente y la salud humana, ajustándose a las necesidades económicas y sociales. Por tanto, se encuentran sujetas a la legislación vigente que determina los contaminantes a tener en cuenta y el nivel de eliminación de los mismos.

Durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales, se van generando dos líneas que han de ir en paralelo: línea de agua y línea de fangos. En la línea de agua tratada se llevan a cabo múltiples operaciones con el fin de reducir la carga orgánica de estas aguas para finalmente ser vertida sobre aguas superficiales (mares, ríos y lagos); además, su utilización para regadío es una alternativa de reutilización y casi una necesidad en zonas áridas. Por otra parte, los residuos sólidos, semisólidos y contaminantes concentrados que son separados del agua residual (línea de fangos) han de ser eliminados. El tratamiento y evacuación del fango es la etapa más costosa y compleja del tratamiento por lo que se ha convertido en el mayor reto de ingeniería ambiental en las EDARs. Las opciones de evacuación son la incineración y la aplicación

directa sobre el terreno o vertederos. Pero la utilización y revalorización de los fangos como una potencial fuente de subproductos de interés, ha generado un impulso en las investigaciones al respecto en la última década (Metcalf y Eddy, 2000).

El volumen de aguas residuales tratadas se ha incrementado notablemente en los últimos años y, en consecuencia, también ha aumentado el fango residual producido. Esto se ha debido al crecimiento de la población humana, la actividad industrial y una legislación cada vez más estricta. En España la generación de fango en las EDARs mantiene una tendencia ascendente hasta el año 2009 como se puede observar en la figura I.1. A pesar de ello, en el último lustro parece haberse estabilizado dicha producción en aproximadamente un millón de toneladas de fango en peso seco (PEMAR, BOE de 22 de octubre de 2015), lo cual puede relacionarse con una optimización del proceso de depuración.

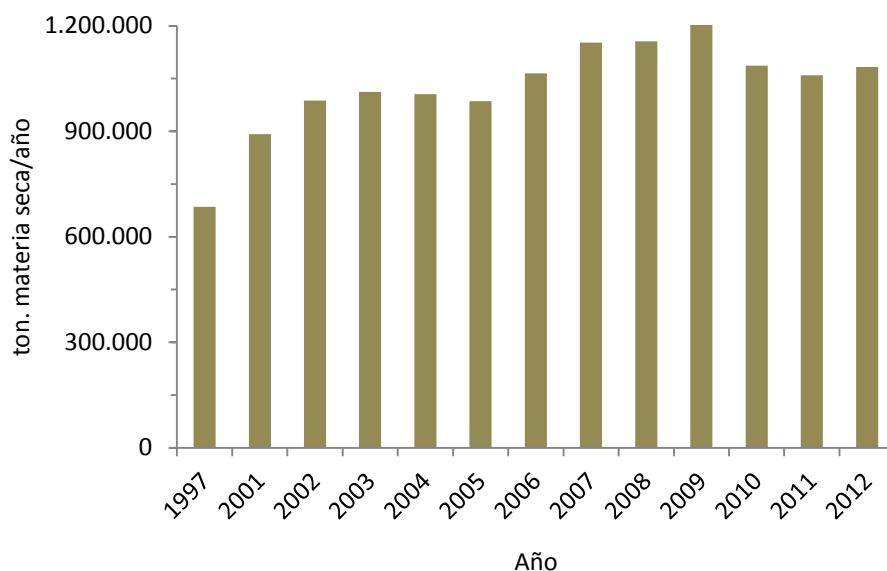


Figura I. 1. Evolución de la generación anual de fango en España expresado en toneladas de materia seca por año. Modificado de PNIR, BOE de 26 de febrero de 2009; PEMAR, BOE de 22 de octubre de 2015 y Eurostat, 2016.

En el resto de Europa, la producción de fango anual ha seguido una tendencia similar, rondando los 10 millones de toneladas en el año 2005 (Fytili y Zabaniotou, 2008); sin apenas variación en la última década registrándose 9,8 millones de toneladas en 2012 (Eurostat, 2016).

El 98% de los fangos generados en la Unión Europea (UE) tienen como destino final vertederos, aplicación sobre el terreno o incineración (Figura I.2). La aplicación directa sobre el terreno está cada vez más restringida debido al riesgo de salud para las personas o el ganado, a causa de los elementos potencialmente tóxicos presentes en los fangos (metales pesados, patógenos, hormonas, compuestos orgánicos xenobióticos, etc.). Además, la superficie disponible para la evacuación en vertederos es cada vez menor.

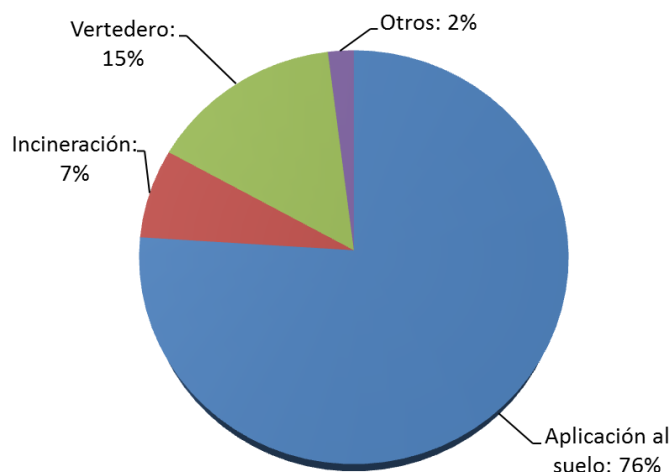


Figura I. 2. Destino final de los fangos en España (expresado en porcentaje, %). Modificado de Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009.

En la ciudad de Sevilla la EDAR de Copero diseñada para una población de 1.000.000 habitantes-equivalente con 255.000 m³ de agua residual diariamente. En consecuencia, se generan más de 42 toneladas en peso seco de fango por día (Befesa Gestión de Residuos S.L, 2012).

I.1.2. Composición de las aguas residuales

El agua residual puede definirse como “el agua de que se desprende la comunidad una vez ha sido contaminada durante los diferentes usos para los cuales ha sido empleada”. Si atendemos a las fuentes de generación, el agua residual es “la combinación de los residuos líquidos, o aguas portadoras de residuos, procedentes tanto de residencias como de instituciones públicas y establecimientos industriales y comerciales, a los que pueden agregarse, eventualmente, aguas subterráneas, superficiales y pluviales” (Metcalf y Eddy, 2000).

En la caracterización del agua residual bruta se puede distinguir lo siguiente:

- *Sólidos totales (ST)*. Sumatorio de los sólidos en suspensión y sólidos sedimentables. A su vez, se clasifican según si su naturaleza es orgánica denominándose sólidos volátiles (SV) o inorgánica conocidos como sólidos no volátiles (SNV).

- *Materia orgánica o sólidos volátiles (SV)*. Principalmente constituida por proteínas, carbohidratos y grasas animales; se determina mediante la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) correspondiente a la materia orgánica biodegradable y de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) correspondiente a la materia orgánica total presente en el agua residual. La presencia de materia orgánica en el agua genera agotamiento del oxígeno y condiciones sépticas.

- *Patógenos*. La presencia de patógenos en el agua residual puede provocar la transmisión de enfermedades a humanos y al resto de seres vivos, un ejemplo serían ciertas bacterias coliformes como *Escherichia coli*.

- *Nutrientes*. El carbono, el nitrógeno y el fósforo, como nutrientes esenciales para el crecimiento, pueden generar la proliferación de vida acuática no deseada y la contaminación de aguas subterráneas (eutrofización).

- *Contaminantes prioritarios*. Se trata de compuestos orgánicos e inorgánicos con características de carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad o toxicidad que deben ser eliminados en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

- *Materia orgánica refractaria*. Compuestos como los tensioactivos, fenoles y pesticidas agrícolas que resisten a los métodos de tratamiento convencionales.

- *Metales pesados*. Son generados principalmente en las aguas residuales procedentes de actividades industriales y es necesario eliminarlos si el agua tratada se destina a su reutilización ya que son bioacumulables.

- *Sólidos inorgánicos disueltos*. Destacan principalmente el calcio, el sodio y los sulfatos que se añaden al agua de suministro y, para determinadas concentraciones, es necesario eliminarlos si se reutiliza el agua tratada (Metcalf y Eddy, 2000).

La composición del agua residual bruta procedente de zonas urbanas se recoge detalladamente en la tabla I.1.

Tabla I. 1. Composición fisico-química del agua residual bruta. Modificado de Metcalf y Eddy, 2000.

Parámetros (mg/L)	Concentración		
	Débil	Media	Alta
Sólidos totales (ST)	350	720	1.200
Sólidos volátiles (SV)	195	365	600
Sólidos no volátiles (SNV)	165	355	600
Sólidos sedimentables	5	10	20
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	110	220	400
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	250	500	1.000
Carbono orgánico total (COT)	80	160	290
Nitrógeno Total (NT)	20	40	85
Fósforo	4	8	15
Materia grasa	50	100	150
Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs, µg/L)	< 100	100-400	> 400
Coliformes totales (nº/100 mL)	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁸ -10 ⁹

Fuente: Metcalf y Eddy, 2000.

I.1.3. Legislación actual sobre el tratamiento de aguas residuales y la evacuación de fangos

El tratamiento de aguas residuales genera fango mediante el proceso de separación de líquidos y sólidos en las EDARs. Estos fangos contienen entre el 0,25 y el 12% de sólidos que tienen que ser incinerados, enviados a vertederos o aplicados sobre el terreno en agricultura (Fytili y Zabaniotou, 2008). Por lo tanto, es necesaria la existencia de un marco legislativo que regule de manera transversal el proceso de depuración y evacuación de fangos.

En España, la gestión del tratamiento de fangos o lodos se ha englobado dentro del Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR). En 2001, se aprobó el Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales-EDAR (PNLD) que correspondía a la gestión del fango entre los años 2001 y 2006 (PNLD, BOE de 12 julio de 2001); lo cual tuvo continuación regulatoria (PNIR 2007-2015). Actualmente, la gestión de lodos se incluye dentro del Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR, 2016-2022) cuyo objetivo principal no difiere mucho de los PNLDs, siendo asegurar la correcta gestión ambiental de los fangos y promover la valorización agrícola de los éstos cuando se den las condiciones ecológicas y tecnológicas apropiadas; destacando el cumplimiento de la Ley 22/2011, de 28 de julio (PEMAR, BOE de 22 de octubre de 2015; Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente, 2016). La legislación nacional, está supeditada a la legislación europea (Ministerio de Medio Ambiente, 2015).

Las primeras regulaciones a nivel de la Unión Europea se sitúan en 1975, mediante las cuales se fomentaba la prevención y la eliminación de desechos para preservar el medio ambiente a través de la Directiva 75/442/CEE.

La Directiva 86/278/CEE estimulaba la utilización de fangos residuales para su aplicación en agricultura; al mismo tiempo que marcaba los límites de las condiciones limitantes de este residuo para su utilización en el medio agrícola: el fango debía haber sido tratado mediante alguno de los métodos de tratamiento existentes: ya fueran de naturaleza biológica, química o de almacenamiento temporal. Esta directiva se transpuso al Derecho interno español mediante el Real Decreto 1310/1990, de 29 de Octubre.

La Directiva 91/271/CEE establece los criterios que los Estados miembros deben aplicar para que las aguas residuales urbanas reciban el tratamiento adecuado antes de ser vertidas. De hecho, uno de los objetivos de esta directiva ha sido que todas las ciudades europeas incluyeran un tratamiento secundario de aguas residuales. Ésta fue ampliada por la Directiva 98/15/CEE presentando unos estándares de calidad más restrictivos para aguas residuales; un ejemplo de esto fue la desaparición progresiva de los vertidos de aguas residuales a medios acuáticos, cuyo horizonte se situaba en el año 2005.

En el año 2000, la Directiva 2000/60/CE fue aprobada para limitar las dioxinas emitidas durante la incineración de fangos residuales; debido a la tendencia ascendente de implantación de este proceso para la eliminación de fangos.

La UE pretendía reducir el residuo final respecto al año 2000 en un 20% para 2010 y un 50% para 2050. Las posteriores directivas (2006/12/CE, 2008/98/CE, 2015/1127/UE) tuvieron como principales estrategias: la prevención, la recuperación, el reciclado y la recuperación energética, mejora de las condiciones de tratamiento, regulación del transporte e implantación de gasificación como una vía de producción energética, concentraciones limitantes en cuanto a calidad del aire y mecanismos económicos como tasas y cargos por contaminación (Eur-lex, 2017; Parlamento Europeo y Consejo, 2008; Comisión Europea, 2015).

Por su parte, en Estados Unidos, entre los años 1960 y 2000, prácticamente se ha triplicado el número de EDARs y tras el Decreto federal ("Clean Water Act") la legislación es más restrictiva especialmente en materia de control de aguas contaminadas para obtener aguas aptas para baño y pesca. De hecho en la actualidad, hay más de 15.000 EDARs en funcionamiento en Estados Unidos. El objetivo es modificar las plantas existentes para que lleven a cabo tratamientos secundarios y terciarios ya que aún existen EDARs con simples tratamientos primarios. Recientemente, se han realizado en EEUU enmiendas a la ley federal sobre el Control de la Contaminación del agua de 1972.

La agencia estadounidense para la protección del medio ambiente (EPA) estableció que para realizar vertidos en aguas superficiales, el tratamiento del agua residual debía ser como mínimo de tratamiento secundario (Metcalf y Eddy, 2000).

En conclusión, a nivel legislativo, tanto Estados Unidos como Europa, mediante sus directivas, pretenden claramente avanzar hacia tratamientos de aguas residuales que permitan que el proceso sea más sostenible ambientalmente. Sin embargo, no se ha conseguido un consenso unificador al respecto entre los países asiáticos a pesar de los enormes volúmenes de residuo que producen: en la India se generaron 26.254 millones de litros de agua residual al día durante el año 2005 frente a los 18.312 millones de litros generados en 1995 (Khursheed y Kazmi, 2011). Por lo tanto, existe una clara tendencia ascendente que aumentará los volúmenes de fangos generados en las próximas décadas; lo cual, puede conllevar severos problemas ambientales ante la ausencia de una legislación restrictiva.

I.1.4. Tratamiento convencional de aguas residuales

El proceso de tratamiento de aguas residuales urbanas se basa en la utilización de diferentes operaciones unitarias que se agrupan en: pretratamiento y tratamientos primario, secundario y terciario (Figura I.3).

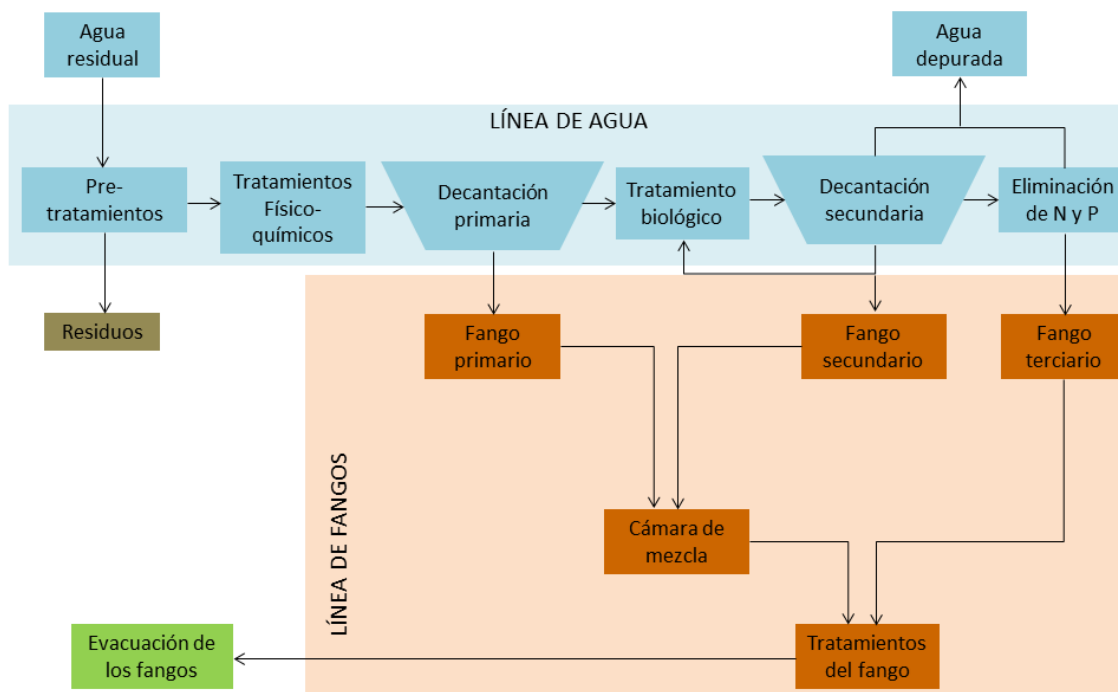


Figura I. 3. Diagrama de flujo del proceso de tratamiento de aguas residuales urbanas. Se muestran en paralelo la línea de agua y la línea de fangos con sus respectivas operaciones físicas, químicas y biológicas durante el proceso de depuración. Modificado de MAPAMA, 2017.

I.1.4.1. Tratamiento primario

En el tratamiento primario, se incluyen las operaciones físicas para eliminar los sólidos sedimentables y flotantes del agua residual. Las operaciones unitarias típicas son: desbaste, mezclado, floculación, sedimentación, flotación, transferencia de gases y filtración:

Desbaste y mezclado. Se llevan a cabo a la entrada del agua residual en la EDAR. Consiste en utilizar una rejilla con aberturas de tamaño uniforme para retener los sólidos gruesos del agua residual bruta.

Sedimentación o decantación. Separación por la acción de la gravedad de las partículas en suspensión que tienen un peso específico mayor que el agua. Una de las operaciones unitarias más utilizadas en las EDARs. Se aplica para la eliminación de las arenas (tanques de decantación primaria), para la materia en suspensión de los flóculos biológicos (procesos de fango activo) y para los espesadores de fango. Se pretende obtener una línea de agua clarificada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la línea de fangos debe ser manejable para las siguientes etapas.

Flotación. Operación unitaria empleada en la separación de partículas sólidas o líquidas de una fase líquida. La separación se produce introduciendo finas burbujas de aire en la fase líquida que se adhieren a las partículas en suspensión formando un conjunto partícula-burbuja que asciende a la superficie aunque la partícula sea más densa que el agua. Se utiliza para la eliminación de materia suspendida y concentración de los fangos biológicos. Además, como ventaja frente a la sedimentación, cabe destacar que el proceso es más rápido y permite separar partículas pequeñas y ligeras que se depositarían a baja velocidad en decantaciones por gravedad.

Filtración. Se elimina la materia particulada haciendo circular el agua a tratar por un lecho granular donde se producen mecanismos de tamizado. El objetivo es la eliminación de sólidos en suspensión de los efluentes de los procesos de tratamientos biológicos y químicos, además de la eliminación de fósforo precipitado químicamente (Metcalf y Eddy, 2000).

Transferencia de gases. Fenómeno mediante el que se transfiere gas de una fase a otra, comúnmente de la fase gaseosa a la fase líquida. Esencial a lo largo de las diferentes etapas del tratamiento que requieren una disponibilidad suficiente de oxígeno como son: los procesos aerobios, la filtración biológica y los fangos activos. Además, la cloración requiere una transferencia de Cl_2 gas al agua tratada y uno de los sistemas de eliminación de nitrógeno es la conversión de nitrógeno en amoníaco que se elimina como gas (Metcalf y Eddy, 2000).

I.1.4.2. Tratamiento secundario

Para la depuración de aguas residuales, se aplican tratamientos secundarios para eliminar la mayor cantidad de materia orgánica posible.

Los bioprocesos, principalmente se centran en la eliminación de la materia orgánica biodegradable en forma coloidal o en disolución. Estas sustancias se transforman en gases y/o se fijan en tejido celular que puede ser sedimentable para su separación de la línea de agua. De hecho, mediante el análisis y control de las condiciones del medio, se puede realizar el tratamiento biológico de la mayor parte de las aguas residuales por lo que un conocimiento de la biología del proceso es fundamental. Sin embargo, la complejidad de los procesos biológicos y la dependencia multi-paramétrica de su efectividad, provocan que el control de este tipo de tratamientos genere dificultades respecto a su robustez.

El objetivo de estos procesos es la eliminación y coagulación de los sólidos coloidales y en suspensión no sedimentables, la estabilización de la materia orgánica y la eliminación de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Además, compuestos tóxicos también pueden ser eliminados por la acción metabólica de los microorganismos.

La eliminación de carbono se produce debido al metabolismo microbiano que realiza la conversión de materia carbonosa en tejido celular y gases (CO_2 y CH_4 , entre otros). El tejido celular se puede separar de la línea de agua debido a su sedimentabilidad.

Metabolismo microbiano

Con la finalidad de una mejor comprensión de los procesos de tratamiento biológico, es necesario conocer los fundamentos del metabolismo microbiano. Un organismo necesita una fuente de energía, una fuente de carbono para la síntesis de materia celular y nutrientes inorgánicos (nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, calcio, hierro, sodio y cloro). El tipo de metabolismo está directamente condicionado por la disponibilidad de oxígeno molecular distinguiéndose entre organismos aeróbicos y anaeróbicos. Además, algunos organismos necesitan nutrientes orgánicos también denominados factores de crecimiento, siendo los principales: aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas.

Para la reducción de materia orgánica, los organismos quimioheterótrofos son los más efectivos ya que tanto su fuente de carbono como de energía es la materia orgánica. En tratamientos específicos para convertir amoníaco en nitrato, destacan positivamente las bacterias nitrificantes quimioheterótrofas.

Las bacterias son los microorganismos más destacados por su importancia en el proceso biológico de depuración. Con respecto a la composición celular, de manera simplificada y generalizada, el 80% es agua y la materia seca se compone de un 90% de materia orgánica y un 10 % de materia inorgánica.

La fracción orgánica se simplifica como $C_5H_7O_2N$ por lo que el 53% de la fracción orgánica es carbono. Los compuestos que constituyen la fracción inorgánica son P_2O_5 (50%), SO_3 (15%), Na_2O (11%), CaO (9%), MgO (8%), K_2O (6%) y Fe_2O_3 (1%). La falta de cualquiera de estos elementos limitará el crecimiento celular. Sin embargo, aunque las bacterias son de importancia vital en la estabilización del residuo orgánico, existe una interacción compleja entre todas las poblaciones de seres vivos presentes en las aguas residuales. Todo ello dependerá a su vez, de la capacidad de control de las condiciones ambientales en la EDAR (Metcalf y Eddy, 2000).

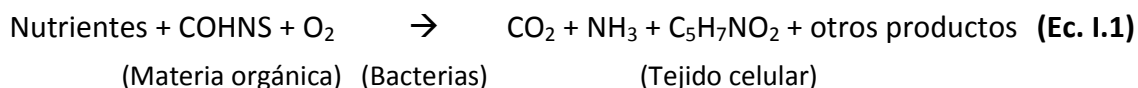
Los procesos de tratamiento biológico se pueden clasificar en aerobios y anaerobios y, a su vez, pueden ser cultivos en suspensión o fijos. A continuación se detalla cada uno de estos procesos.

Procesos de tratamiento aerobio. Estos procesos de tratamiento biológico se producen en presencia de oxígeno y se distingue entre cultivos en suspensión o inmovilizados.

Cultivos aerobios en suspensión. Procesos de tratamiento biológico en los que los microorganismos que realizan la conversión de materia orgánica en gases y tejido celular, se encuentran en suspensión dentro del medio líquido. Destacan los procesos de fangos activados (diferentes variantes), lagunas aireadas, reactores biológicos secuenciales (RBS) y digestores aerobios.

- *Fangos activados convencionales (FAC).* Es el proceso más utilizado para la eliminación de DBO carbonosa. En 1914, Arden y Lockett desarrollaron este proceso en Inglaterra. Consiste en la producción de una masa activada de microorganismos aerobios con la capacidad de estabilizar un residuo. En el proceso FAC, la línea de agua residual resultante de las anteriores etapas de tratamiento, se introduce en un biorreactor donde se mantiene un cultivo en suspensión aerobio degradando la materia orgánica y fijando la biomasa bacteriana que posteriormente es separada mediante decantación (Figura I.4A). Otra posibilidad es la utilización de biorreactores de membrana (MBR) que permiten una filtración posterior (Figura I.4.B). El contenido del biorreactor se denomina “líquido mezcla”, produciéndose las siguientes reacciones de conversión (Ec. I.1 y Ec. I.2):

a) Oxidación y síntesis:



Cuando se agota el suministro de sustrato disponible, los organismos consumen su propio protoplasma para obtener energía y las reacciones de mantenimiento celular; por tanto, se lleva a cabo un metabolismo endógeno (Ec. I.2).

b) Respiración endógena:

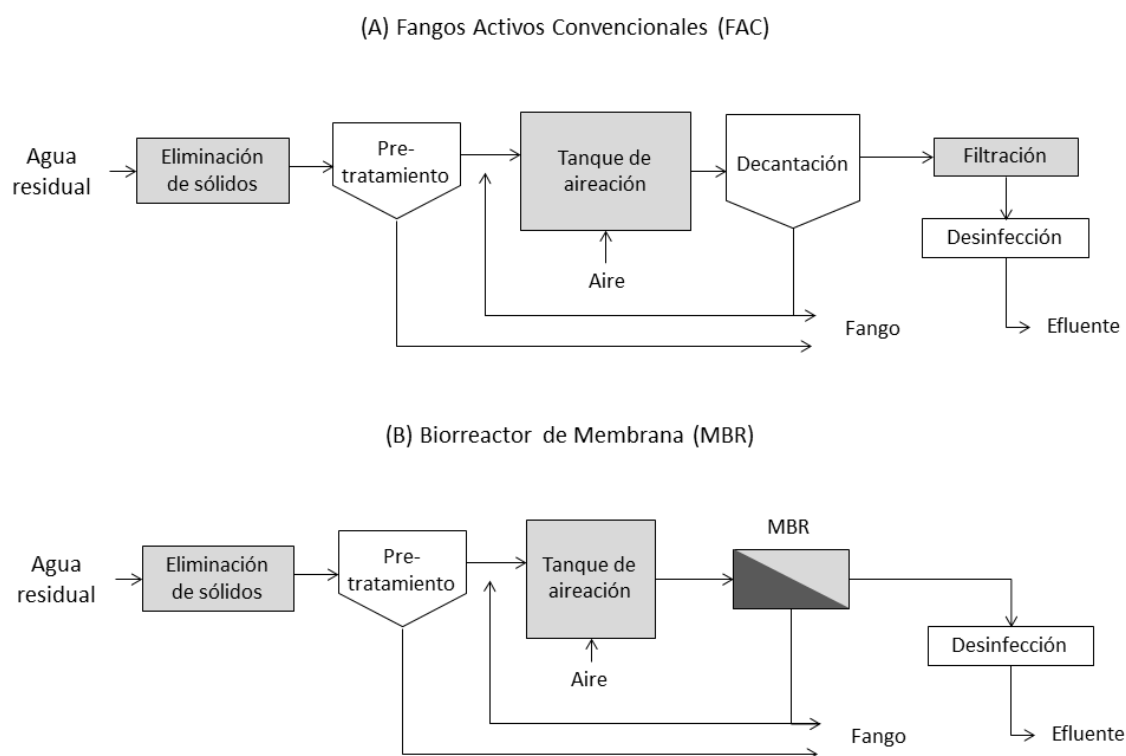
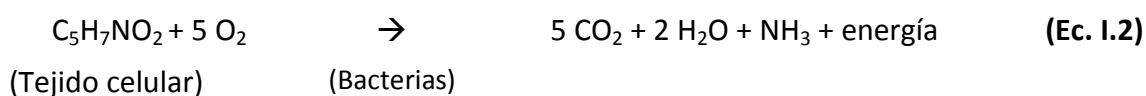


Figura I. 4. Proceso de fangos activos: (A) cultivo convencional en suspensión y (B) sistema biorreactor de membrana (MBR). Modificado de Pandey y Singh, 2014.

Como descripción simplificada del proceso, se utiliza un reactor de mezcla completa que es aireado mediante difusores y agitado mecánicamente para mantener las condiciones aerobias y de homogeneización. Tras un periodo de tiempo concreto, el líquido mezcla se conduce hasta un tanque de sedimentación para separar el agua

residual tratada del tejido celular. Una parte de estas células son recirculadas al reactor para mantener la concentración adecuada de microorganismos y la mayor parte de este tejido celular es purgado del sistema generando el denominado “fango en exceso” que es bombeado hacia las unidades de espesamiento del fango (Figuras I.3-I.4).

Por tanto, los microorganismos producen descomposición de la materia orgánica del influente para generar tejidos celulares y obtener energía; además, una pequeña parte se oxida a compuestos de bajo contenido energético como el NO_3^- , el SO_4^{2-} o el CO_2 .

Los géneros bacterianos principales que intervienen en el proceso de fangos activos son: *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y las dos bacterias nitrificantes más comunes, los *Nitrosomas* y las *Nitrobacter*. Otras bacterias filamentosas comunes son *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Lecicothrix* y *Geotrichum* (Metcalf y Eddy, 2000).

Por otra parte, hay que señalar que protozoos y rotíferos tienen efectos de refinado del efluente ya que los protozoos se alimentan de bacterias que no hayan flocculado y los rotíferos de cualquier partícula no sedimentada (Metcalf y Eddy, 2000).

Para la separación en el sedimentador secundario, es fundamental la formación de flóculos con las características adecuadas. Por ello es importante un tiempo de retención óptimo que oscila entre 3 y 4 días. Además, la presencia de algunos organismos puede dificultar la formación de flóculos como es el caso de organismos filamentosos como *Sphaerotilus* y *Thiothrix*, *E. coli* y hongos. De hecho, la existencia de una elevada abundancia de organismos filamentosos en el líquido mezcla durante el proceso de fangos activos, se denomina “bulking”. En esta situación, se genera un tipo de flóculos cuyas características son indeseadas por su elevado volumen y baja consistencia que impiden una correcta sedimentación. Estos organismos son bacterias filamentosas, actinomicetos y hongos. Las estrategias para evitar el “bulking” son diversas: adición de cloro al fango activado de retorno, alteración de la concentración de oxígeno disuelto, alteración de los puntos de alimentación de agua a tratar, adición de nutrientes básicos (nitrógeno y fósforo) o mediante la mezcla del fango de retorno con el agua residual entrante en un tanque anóxico (selector).

Otra posibilidad, es la utilización de un sistema de flujo pistón. Idealmente, en este sistema cada partícula que entra en el reactor, permanece en su interior por idéntico periodo de tiempo; lo cual hace que el proceso sea más eficiente que en un reactor de mezcla completa. Sin embargo, en la práctica, el sistema de flujo pistón no se suele comportar idealmente, además, es más sensible a elevadas cargas orgánicas puntuales.

- *Lagunas aireadas*. Desarrolladas a partir de estanques de estabilización facultativos, con aireadores de superficie para evitar malos olores causados por las sobrecargas orgánicas. El proceso es equivalente a los fangos activados pero con un mayor tiempo de retención y menor control del proceso.

- *Reactor biológico secuencial (RBS)*. Es un sistema de tratamiento de fangos activados basado en una secuencia de ciclos de llenado y vaciado. En ambos sistemas se realizan las etapas de aireación y sedimentación-clarificación. La principal diferencia es que en el sistema FAC los procesos suceden al mismo tiempo en tanques separados (reactor biológico y decantador) mientras que en el sistema RBS, se realizan secuencialmente y en el mismo tanque los procesos de: llenado, aireación, sedimentación (clarificación), vaciado (decantación) y fase de inactividad. Cabe mencionar que debido a que todas las etapas se realizan en el mismo tanque, no es necesaria una recirculación del fango aunque sí una purga del fango en exceso.

- *Digestión aerobia*. Es un método comúnmente empleado en el tratamiento de los fangos que se producen en las diferentes etapas del proceso de depuración. Existen tres variantes: convencional, inyectando oxígeno puro o con bacterias termófilas. Consiste en airear un tanque lleno de fango durante un largo periodo de tiempo para finalmente sedimentarlo. Las variaciones del sistema como el uso de bacterias termófilas y aplicación de temperaturas de entre 25 y 50°C, permiten conseguir altos rendimientos de eliminación (mayores al 80% de la materia orgánica) y que el tiempo de retención sea corto (entre 3 y 4 días).

Cultivos aerobios inmovilizados. Los microorganismos que realizan la conversión de materia orgánica en gases y tejido celular, se mantienen fijados a medios inertes como piedras, escorias, material cerámico o plásticos especialmente diseñados para este tipo de procesos. Los principales procesos de este tipo son filtros percoladores, filtros de desbaste, biodiscos (sistemas biológicos rotativos de contacto) y reactores de lecho compacto. La finalidad de los cultivos aerobios fijos es la eliminación de materia orgánica del agua residual y para la conversión del nitrógeno amoniacal en nitrato (proceso de nitrificación). Los filtros percoladores son los más utilizados (Metcalf y Eddy, 2000).

Procesos de tratamiento anaerobios. Estos procesos de tratamiento biológico se llevan a cabo en ausencia de oxígeno y también se clasifican en procesos en suspensión e inmovilizados.

Procesos anaerobios en suspensión. Los principales procesos son la digestión anaerobia, el proceso anaerobio de contacto y el manto de fango anaerobio de flujo ascendente.

- *Digestión anaerobia*. Es el proceso más empleado, siendo uno de los sistemas más antiguos para la estabilización de la materia orgánica y de los sólidos biológicos mediante la descomposición de la materia orgánica e inorgánica en ausencia de O₂. Su aplicación principal es la estabilización de fangos, que se han concentrado a lo largo del proceso de depuración.

La mezcla de fangos primarios y biológicos es digerida para la conversión de materia orgánica en metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂). Para ello, se mantienen condiciones de anaerobiosis en un reactor totalmente cerrado. El fango digerido ya estabilizado, tiene un bajo contenido tanto en materia orgánica como en patógenos; además, no es susceptible de putrefacción. Existen varios sistemas de digestión anaeróbica, 1) el proceso convencional de baja carga con tiempos de detención de entre 30 y 60 días o 2) el proceso de tanque en mezcla completa con calentador de fango con tiempos inferiores a 15 días. A su vez existen sistemas combinados de los dos procesos anteriores.

Durante la digestión anaerobia se distinguen 3 etapas: *hidrólisis* (1), consiste en la transformación enzimática de compuestos de elevado peso molecular (lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos) en compuestos utilizables como fuente de energía y de carbono por las células (ácidos grasos, monosacáridos, aminoácidos, purinas y pirimidinas). La *acidogénesis* (2) consiste en la conversión bacteriana de los compuestos resultantes de la primera etapa en compuestos intermedios de menor peso molecular (lactato, succinato, etanol, CO₂, H₂, formiato, metanol, acetato, metilaminas, etc.). Finalmente, se produce la *metanogénesis* (3) en la cual las bacterias convierten los compuestos intermedios en productos finales simples: CH₄ (50-75%), CO₂ (25-45%), H₂O (2-7%), H₂ (<1%), N₂ (<2%), O₂ (<2%) y H₂SO₄ (<1%) (Seadi et al., 2008). Consecuentemente, participan diversos grupos de microorganismos que desempeñan funciones complementarias. Existen microorganismos que realizan la hidrólisis. Otras bacterias realizan fermentaciones que generan ácidos orgánicos simples como el ácido acético por lo que se denominan acidogénicas o “no metanogénicas”. El tercer grupo de microorganismos, transforma el ácido acético y el hidrógeno en gas metano y dióxido de carbono; éstos son bacterias anaerobias estrictas y se denominan “metanogénicas”, algunos géneros son *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanococcus* y *Methanosarcina*.

Las reacciones más destacables de este proceso de digestión anaerobia son:



Las bacterias acidogénicas y metanogénicas tienen relaciones sintrópicas por lo que un equilibrio dinámico entre estas poblaciones, beneficia a ambas. Para ello es fundamental la presencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, un pH entre 6,6 y 6,7 y temperaturas entre 30 y 38°C (mesófilas) o entre 49 y 57°C (termófilas) (Metcalf y Eddy, 2000).

Además, cabe señalar que el metabolismo de las bacterias metanogénicas es lento por lo que se considera un factor limitante del proceso de digestión anaerobia lo cual conlleva tiempos de detención más elevados que en procesos aerobios. El aumento de la temperatura puede disminuir este tiempo de retención pero con un coste energético asociado como inconveniente.

Sin embargo, es de interés que en este tipo de metabolismo, existe una baja generación de tejido celular *de novo* y que el gas metano es un combustible útil para la producción de energía. Por tanto, la materia sólida resultante está bastante bien estabilizada y tras el proceso de deshidratación y secado puede ser evacuada en vertederos, utilizada para compostaje o para la aplicación sobre el terreno. En cambio, en los procesos aerobios se generan fangos con alto contenido de materia orgánica por lo que suele ser necesaria una digestión anaeróbica como tratamiento posterior.

- *Otros sistemas anaerobios en suspensión* son: el proceso anaerobio de contacto empleado para residuos industriales con alto valor de DBO y el proceso anaerobio de manto de fango de flujo ascendente en el cual la entrada de agua residual se realiza por la parte inferior del reactor, contactando con partículas granuladas de fango en las que se produce metano y dióxido de carbono, estos gases mantienen un flujo ascendente hasta su recogida en la parte superior del reactor (Metcalf y Eddy, 2000).

Procesos anaerobios inmovilizados. Los sistemas fijos anaerobios consisten en columnas con materiales donde se fijan los microorganismos: filtro anaerobio y lecho expandido. Su principal ventaja es una producción de fangos menor a sistemas aerobios aunque actualmente su aplicación es menos común frente a los procesos de digestión aerobia y anaerobia.

Eliminación biológica de nutrientes

Los nutrientes pueden causar un impacto negativo en la zona de vertido. Destacan principalmente el nitrógeno y el fósforo como nutrientes a eliminar en la línea de agua. Los procesos biológicos son un buen sistema de eliminación y el coste es bajo.

- *Eliminación del nitrógeno.* El nitrógeno se encuentra presente en diversas formas en las aguas residuales y dado que es un nutriente, los microorganismos tienden a incorporar el nitrógeno a su tejido celular; por tanto, la lisis celular causa un retorno del nitrógeno amoniacal al agua. Los mecanismos de transformación del nitrógeno amoniacal en productos separables del agua son la asimilación y la nitrificación-desnitrificación. En la nitrificación, el amoníaco se convierte en nitrato (en presencia de oxígeno). En la desnitrificación el nitrato es convertido en nitrógeno gas que se elimina fácilmente.

Los dos géneros de bacterias que realizan la nitrificación son *Nitrosomas* (oxidación del amoníaco en nitrito) y *Nitrobacter* (transformación del nitrito en nitrato). En este proceso no se elimina el nitrógeno pero sí se disminuye su demanda de oxígeno. El pH óptimo se encuentra entre 7,5 y 8,6 aunque existen algunos sistemas que realizan la nitrificación a pH más bajos (Metcalf y Eddy, 2000).

Por su parte, la aplicación de este proceso puede incluirse en el mismo reactor donde se lleva a cabo la eliminación de materia carbonosa en el proceso convencional de fangos activados o en un reactor independiente posterior (Metcalf y Eddy, 2000).

La desnitrificación se considera la verdadera etapa de eliminación del nitrógeno y se lleva a cabo en condiciones de anoxia. Algunas de las bacterias que realizan este proceso son *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Spirillum*. El pH óptimo está entre 7 y 8, son necesarias condiciones de anoxia y la disponibilidad de una fuente de carbono (Metcalf y Eddy, 2000).

- *Eliminación del fósforo.* Mediante el control de las condiciones ambientales se puede conseguir que los microorganismos consuman fósforo por encima de sus necesidades basales. La posterior purga de los microorganismos, permite la eliminación de este nutriente que suele encontrarse en el agua residual como ortofosfato (PO_4^{-3}), polifosfato (P_2O_7) y formas orgánicas. Entre el 10 y el 30% del fósforo se elimina en el tratamiento biológico secundario ya que los microorganismos utilizan el fósforo para el transporte de energía y síntesis celular. Secuencialmente se alternan anaerobiosis y aerobiosis para promover una mayor eliminación de fósforo (Metcalf y Eddy, 2000).

I.1.4.3. Tratamiento terciario

Debido a la cada vez más estricta legislación, es necesario ir incorporando tratamientos más avanzados a las EDARs que solo realizan tratamientos primarios y secundarios. En esta fase del tratamiento avanzado se realiza la eliminación de sólidos en suspensión y sustancias disueltas que permanecen en el agua residual después de los tratamientos primarios y secundarios. Estos compuestos pueden ser: materia orgánica, iones inorgánicos (calcio, potasio, sulfato, nitrato y fosfato) y compuestos orgánicos complejos (Metcalf y Eddy, 2000).

La descripción de los tratamientos terciarios no se abordará en detalle puesto que no tiene especial relevancia en este trabajo de investigación. Sin embargo, cabe mencionar algunos de los procesos aplicados.

Entre los métodos físicos más comúnmente aplicados en el tratamiento terciario de aguas residuales se encuentran: filtración en medio granular y microtamizado (eliminación de sólidos en suspensión), filtros percoladores (eliminación de nitrógeno), ultrafiltración u ósmosis inversa (eliminación de fósforo) y electrodiálisis (eliminación de sustancias inorgánicas disueltas).

En cuanto a los métodos químicos más utilizados para la eliminación o conversión de los contaminantes destacan: precipitación química (eliminación de fósforo mediante adición de sales metálicas y cal), adsorción (columnas de carbón activado) y desinfección (cloración, ozonización o rayos UV).

I.1.5. Línea de fangos

El tratamiento de aguas residuales en una EDAR permite finalmente tener un efluente de agua depurada que puede incorporarse a los cauces naturales de agua. Sin embargo, se generan residuos finales como basuras, arenas, espumas y fangos. El fango, sin duda es el residuo más voluminoso y problemático por lo que su tratamiento y evacuación es objeto de estudio en este trabajo de investigación debido a su influencia en la viabilidad económica, ambiental y legal de las EDARs.

El fango es un líquido semisólido con un contenido en sólidos que, dependiendo del proceso de tratamiento, varía entre 0,25 y 12% (peso seco). Los problemas del manejo de fango son complejos debido a que lo componen sustancias desagradables (mayoritariamente bacterias). Por tanto, los objetivos se centran en la recuperación del agua, disminución del contenido en materia orgánica y la estabilización del fango para su reutilización o evacuación final. En este sentido, se realizan operaciones para eliminar la humedad como: espesamiento, acondicionamiento, deshidratación y secado. A su vez, para el tratamiento de la materia orgánica se aplican las siguientes operaciones: digestión, compostaje, incineración, oxidación húmeda y reactores de tubo vertical.

Finalmente, cabe destacar que la importancia de la disminución y eliminación del fango, radica en que el 60% del coste de las EDARs se debe al tratamiento del fango final (Buys et al., 2008).

I.1.5.1. Composición y origen de los fangos

El fango están constituido principalmente por componentes orgánicos no tóxicos (en torno al 60%), nitrógeno orgánico e inorgánico, fósforo, metales pesados (Zn, Ni, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, As, etc.), trazas de pesticidas, dioxinas, compuestos fenólicos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, microbios bacterianos, virus, patógenos, depredadores, etc. Algunos de estos componentes son reutilizables, mientras que otros son potencialmente peligrosos para la salud pública y el medio ambiente (Khursheed y Kazmi, 2011).

Las características de los fangos dependen principalmente del tipo de agua residual, del tratamiento llevado a cabo en la EDAR y de la edad del fango. En la figura I.5 se puede observar el diagrama de flujo de generación de fangos y en la tabla I.3 se muestra el origen y la descripción de los diferentes fangos más comunes.

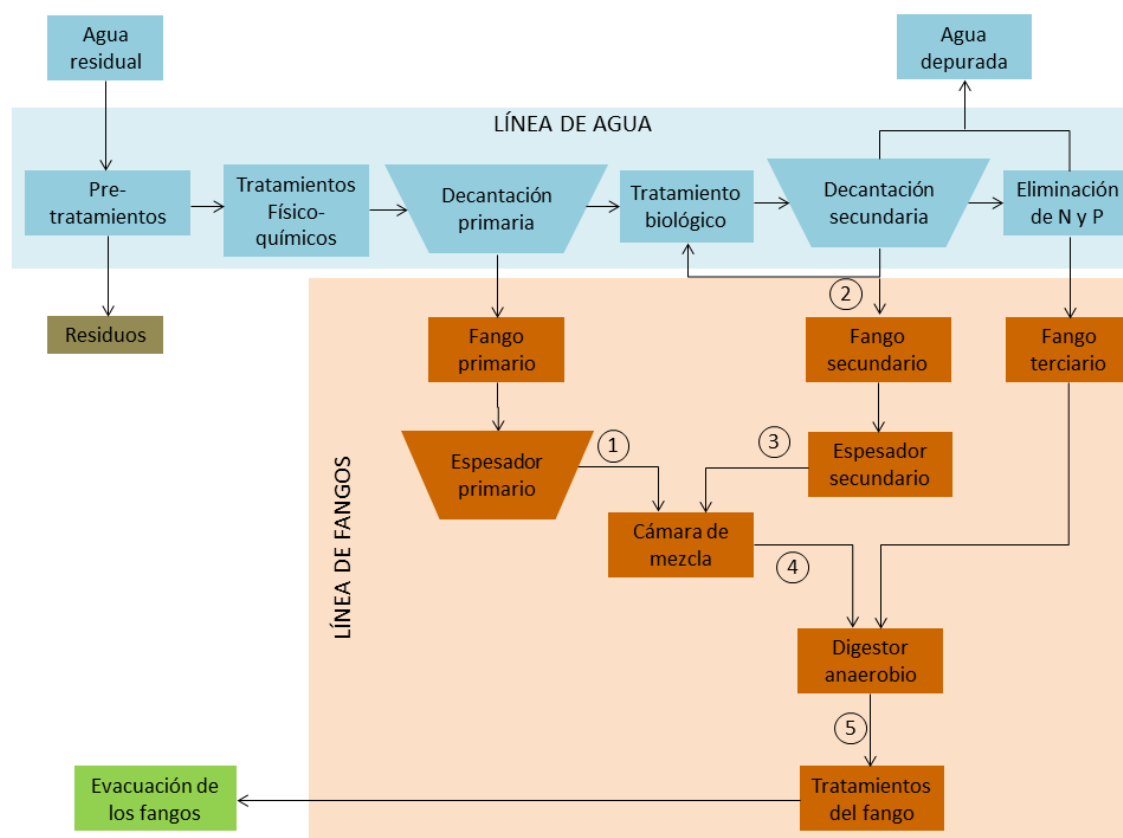


Figura I. 5. Diagrama de flujo del proceso de tratamiento del fango (1-espesador primario, 2-recirculación biológica, 3-espesador secundario, 4-cámara de mezcla y 5-digerido, anaeróticamente). Modificado de MAPAMA, 2017.

Tabla I. 3. Características de los fangos más comunes generados en las EDARs. Modificado de Metcalf y Eddy, 2000.

Fango	Operación unitaria que genera el fango	Descripción
Primario	Decantación	Color gris. Grasiento. Olor molesto. Puede digerirse fácilmente.
Activado	Sedimentación y purga	Color marrón y apariencia floculenta. Un color oscuro indica que está próximo al estado séptico. Olor a tierra.
Secundario	Flotación	Color marrón. Apariencia floculenta. Olor a tierra.
Cámara de mezcla	Mezclado	Combinación de los fangos primarios y secundarios.
Digerido	Digestión anaerobia	Color marrón oscuro-negro. Cantidad elevada de gas. Olor débil y apariencia de alquitrán caliente.
Digerido	Digestión aerobia	Color marrón-marrón oscuro. Apariencia floculenta. Olor débil.

La tabla I.3 muestra uno de los parámetros más característicos del fango: la concentración de sólidos totales. Se observa que el fango primario contienen el mayor porcentaje de sólidos totales.

Tabla I. 3. Valor típico de concentración de sólidos totales (ST) y densidad (ρ) para los fangos más comunes. Modificado de Metcalf y Eddy, 2000.

Tipo de fango	Proceso de origen	% ST		ρ (g/ml)
		Intervalo	Valor típico	
Fango primario	Decantación primaria	4-10	5	-
Fango activo en exceso purgado	Sedimentación secundaria	0,5-1,5	0,8	1,005
Fango primario concentrado	Espesador por gravedad	5-10	8	1,020
Fango activado en exceso concentrado	Espesador de flotación	3-5	4	-
Fango digerido (activado en exceso y fango primario)	Digestor anaerobio	1,5-4	2,5	-

En la tabla I.4 se muestran las características detalladas de los fangos primario crudo, fango digerido y fango activado según (Fytili y Zabaniotou, 2008).

Tabla I. 4. Composición típica del fango primario crudo, fango digerido y fango activo. Modificado de (Fytili y Zabaniotou, 2008).

Características	Fango primario crudo		Fango digerido (digestión anaerobia)		Fango activado
	Intervalo	Valor típico	Intervalo	Valor típico	Intervalo
Sólidos totales, ST (%)	2-8	5	6-12	10,0	0,83-1,16
Materia orgánica (% de ST)	60-80	65	30-60	40	59-88
Cenizas (% de ST)	20-40	35	40-70	60	12-31
Grasas y aceites (% de ST)	6-35	-	5-20	18	5-12
Proteínas (% de ST)	20-30	25	15-20	18	32-41
Nitrógeno (N, % de ST)	1,5-4	2,5	1,6-6	3	2,4-5
Fósforo (P ₂ O ₅ , % de ST)	0,8-2,8	1,6	1,5-4	2,5	2,8-11
Potasio (K ₂ O, % de ST)	0-1	0,4	0-3	1	0,5-0,7
Celulosa (% de ST)	8-15	10	8-15	10	-
pH	5-8	6	6,5-7	7	6,5-8
Poder calorífico (MJ/kg)	23.000-29.000	25.500	9.000-13.500	11.500	18.500-23.000

Con respecto a los metales pesados, la tabla I.5 muestra el contenido de distintos metales pesados en el fango (Fytili y Zabaniotou, 2008). En general, son componentes trazas que a bajas concentraciones pueden ser tóxicos.

Tabla I. 5. Concentraciones típicas de metales pesados en el fango y valores máximos para su evacuación en suelos agrícolas (Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre). Modificado de Metcalf y Eddy, 2000.

Metal	Fango seco (mg/kg)		[Metal] máxima permitida para la deposición en suelos agrarios (mg/kg)	
	Intervalo	Valor típico	Suelos con pH < 7	Suelos con pH > 7
Arsénico	1,1-230	10	-	-
Cadmio	1-3.410	10	20	40
Cromo	10-99.000	500	1.000	1.500
Cobalto	1,3-2.490	30	-	-
Cobre	84-17.000	800	1.000	1.750
Hierro	1.000-154.000	17.000	-	-
Plomo	13-26.000	500	750	1.200
Manganeso	32-9.870	260	-	-
Mercurio	0,6-56	6	16	25
Molibdeno	0,1-214	4	-	-
Níquel	2-5.300	80	300	400
Selenio	1,7-17,2	5	-	-
Estaño	2,6-329	14	-	-
Zinc	101-49.000	1.700	2.500	4.000

Actualmente, los fangos se aplican sobre el terreno en cuyo caso los principales componentes a tener en cuenta en los fangos son: materia orgánica, nutrientes, patógenos, metales pesados y otros compuestos tóxicos. Para la aplicación como fertilizantes, los fangos deben tener un contenido rico en nitrógeno, fósforo y potasio.

I.1.5.2. Gestión y tratamiento general para la reducción del fango en las EDARs

El proceso de tratamiento del fango tiene las siguientes etapas de manera genérica: tratamiento preliminar (cribado), espesamiento primario (decantación por gravedad), espesamiento secundario (flotación principalmente), estabilización del fango líquido (digestión anaerobia, digestión aerobia, adición de limo), acondicionamiento (químico o térmico), deshidratación (centrifugación), tratamiento final (compostaje, secado, incineración, etc.), almacenamiento, transporte y evacuación final a vertederos y aplicación agrícola, revisado en (Fytili y Zabaniotou, 2008).

En la figura I.6 se puede observar uno de los procesos más comunes en el tratamiento de fangos: espesamiento por flotación del fango activo en exceso, decantación del fango primario, digestión (anaerobia en este caso), acondicionamiento químico y deshidratación para finalmente ser evacuado.

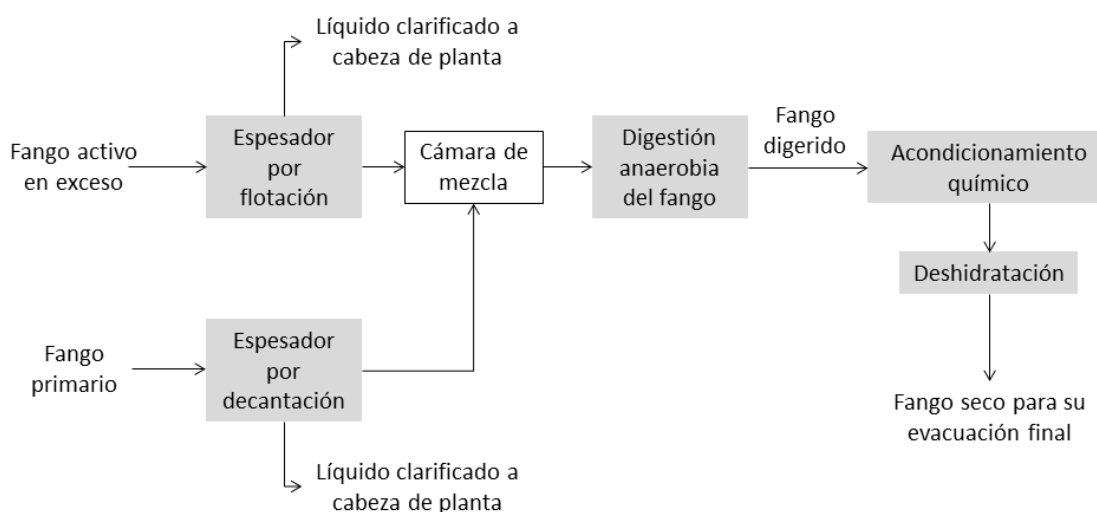


Figura I. 6. Diagrama de flujo simplificado de un proceso de tratamiento típico del fango generado en una EDAR.

Con respecto al fango final se distinguen diferentes destinos; en general, se llevan a cabo procesos de conversión del fango en sustancias de interés como metano, compost o se almacena para finalmente ser repartido sobre el terreno sin impactos negativos. Por otra parte, el fango con sustancias potencialmente peligrosas, principalmente de origen industrial, no se reutiliza (Fytili y Zabaniotou, 2008).

Los tratamientos del fango final más comunes utilizados en Europa son: pasteurización, digestión anaerobia, digestión aerobia, compostaje, estabilización con limo y secado (Fytili y Zabaniotou, 2008).

En la figura I.7 se puede observar un diagrama general de los distintos tratamientos del fango.

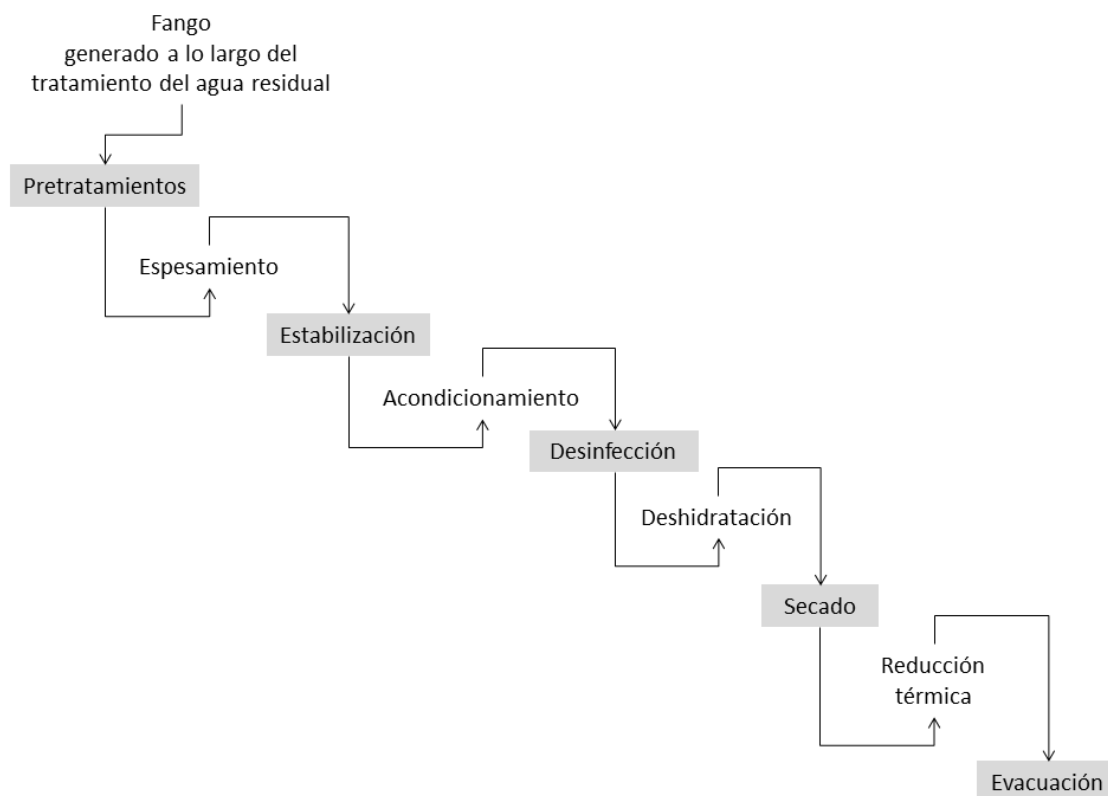


Figura I. 7. Diagrama de flujo de los diferentes tratamientos del fango generado en una EDAR.

A continuación se describen brevemente los diferentes tratamientos del fango:

1- Pretratamientos del fango. El fango es sometido a diferentes operaciones como son: separación de grandes sólidos (pozo de grueso), desbaste, tamizado, dilaceración, desarenado, desaceitado-desengrasado y preaireación.

2- Espesado del fango. Los fangos producidos en el tratamiento del agua residual poseen más del 95% de agua. El espesado o la concentración del fango es un procedimiento empleado para aumentar el contenido de sólidos en el fango generado por eliminación parcial de la fracción líquida. Los principales métodos de espesado son de naturaleza física: gravedad, flotación, centrifugación y filtración; donde los sobrenadantes del espesamiento se retornan a la cabecera de planta normalmente. La

reducción del volumen es de interés para disminuir costes y aumentar la efectividad de los tratamientos posteriores: digestión, deshidratación, secado y reducción térmica.

2.1- Espesado por gravedad. Se aplica a los fangos primarios y mixtos; llevándose a cabo en tanques similares a los sedimentadores convencionales, recogiendo el fango densificado en la parte inferior del tanque.

2.2- Espesado por flotación. Está indicado para concentrar los fangos biológicos procedentes del decantador secundario (fango en exceso). La flotación se puede realizar por aire disuelto, al vacío y por dispersión de aire. El sistema de flotación más utilizado es por aire disuelto en una solución a determinada presión. Este aire es despresurizado generando microburbujas que arrastran los sólidos hacia la superficie donde se recoge dicho fango concentrado. La efectividad del proceso depende principalmente de la relación aire-sólidos, el índice de volumen del fango (IVF), la carga de sólidos y la aplicación de polímeros.

2.3- Otros procesos de espesado menos comunes son la centrifugación, la filtración y el uso de tambores rotativos que suelen utilizarse para los fangos que difícilmente liberan el agua que contienen.

3- Estabilización. Se realiza la estabilización del fango para reducir la presencia de patógenos, eliminar olores y reducir su potencial de putrefacción. Para ello, se actúa sobre la fracción orgánica del fango con el objetivo de reducirla.

3.1- Digestión aerobia. Se produce la degradación de la materia orgánica mediante la aireación prolongada provocando que la materia orgánica sea digerida por vía aerobia.

3.2- Digestión anaerobia. Proceso de estabilización más antiguo y extendido. Se basa en la descomposición de la materia orgánica en ausencia de oxígeno.

3.3- Deshidratación. Operación unitaria física (mecánica) cuyo objetivo es disminuir el contenido en humedad del fango para reducir los costes de transporte del residuo o posteriores tratamientos como la incineración y el compostaje. Los métodos empleados son: filtración, centrifugación o utilización de eras de secado. Igualmente a la deshidratación, la operación de secado térmico permite obtener humedades inferiores al 10%, lo cual es necesario cuando el fango es convertido en fertilizante.

3.4- Compostaje. Proceso mediante el cual la materia orgánica es degradada biológicamente hasta convertirse en un producto final estable, higiénico y semejante al humus. Entre el 20 y el 30% de la materia orgánica se convierte en CO₂ y agua; además, la pasteurización destruye los patógenos entéricos. Se puede aplicar sobre el terreno agrícola o en vertederos. Alternativa para la gestión del fango en su estabilización y evacuación final (Metcalf y Eddy, 2000).

3.5- Desinfección. Actualmente, debido a las normativas, es cada vez más importante el proceso de desinfección que se realiza cuando el fango es reutilizado o aplicado sobre el terreno, principalmente. Existen diversos métodos de desinfección, destacando la pasteurización y el almacenamiento. En el proceso de pasteurización, los fangos húmedos se someten a 70°C durante 30 minutos inactivando cistos y huevos de parásitos. Se puede realizar mediante inyección directa de vapor o por intercambio indirecto de calor. Por otra parte, el almacenamiento en lagunas excavadas en el suelo permite desinfectarlo a partir de 60 días de detención para temperaturas de 20°C.

3.6- Tratamiento térmico. La temperatura se eleva hasta 260°C a presiones de 2.760 kN/m² durante 30 minutos.

3.7- Evacuación final del fango. En la actualidad, en torno al 40% del fango generado en Europa sigue teniendo como destino el depósito en vertederos, el 37% se utiliza como fertilizante en agricultura, el 11% es incinerado y el 12% se dedica a otras áreas como la reforestación. Recientemente, la utilización de los fangos como fuente de energía empieza a tener un creciente interés científico e industrial (Fytily y Zabaniotou, 2008).

En este sentido, la reducción térmica permite reducir el volumen de fango, convirtiendo los sólidos orgánicos en productos oxidados (CO₂ y H₂O principalmente) mediante incineración u oxidación húmeda. Otra posibilidad de reducción térmica es la oxidación y volatilización de los sólidos orgánicos mediante pirólisis o combustión. Se consigue la máxima reducción de volumen, sin embargo, los costes económicos de explotación son elevados y los gases pueden ser contaminantes ambientales a tener en cuenta (Metcalf y Eddy, 2000). Este proceso se desarrollará en más profundidad en el apartado I.2.1.

La utilización de fango en agricultura se basa principalmente en el contenido de nitrógeno y fósforo de este residuo; ya que son elementos esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, aparecen diversos impedimentos por la presencia de elementos indeseados como los metales pesados. Además, existen problemas técnicos como que la producción de fango duplica la cantidad aplicable en agricultura anualmente por lo que existirían excedentes que habría que almacenar. Por otra lado, a nivel social existen reticencias por parte de: agricultores, consumidores, industria alimentaria y comerciantes; siendo imprescindible un consenso por todas las partes implicadas (Fytily y Zabaniotou, 2008).

I.2. Alternativas para reducción de fango

En todas las estaciones de depuración de aguas residuales, el fango representa un desafío por los grandes volúmenes generados como resultado de la separación de la materia sólida del agua. Por lo tanto, la gestión y eliminación de este fango presenta un problema real que necesita ser resuelto (Khursheed y Kazmi, 2011).

Como se ha indicado anteriormente, los procesos más comunes para la disminución del volumen de agua del fango son la decantación, el espesamiento y la deshidratación. Sin embargo, la cantidad de fango continúa siendo elevado por lo que son necesarios tratamientos más específicos que reduzcan tanto el volumen acuoso como la materia orgánica del fango.

Los tratamientos de reducción de fango se clasifican en tres tipos de tratamiento: térmicos, químicos y biológicos.

I.2.1. Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos más extendidos son: incineración, combustión, oxidación húmeda, pirólisis y gasificación.

- *Incineración*. Se trata del proceso más extendido, la principal ventaja es la enorme reducción del volumen del fango ya que se genera un 10% del residuo respecto a la deshidratación mecánica. Se destruyen las toxinas orgánicas y la energía generada en la combustión puede recuperarse parcialmente. Además, la tecnología de incineración ha mejorado los rendimientos y eficiencia energética en la última década. A pesar de ello, la energía necesaria para calentar es muy costosa y es necesaria una ampliación de equipos para controlar la contaminación del aire por las emisiones (Fytili y Zabaniotou, 2008).

Por otra parte, el 30% del residuo generado son cenizas que presentan un elevado contenido en metales pesados. Además, las emisiones gaseosas presentan posibles efectos contaminantes. Estos problemas pueden paliarse con la aplicación de tecnologías mejoradas; de hecho, en algunos países la incineración supera el 11% de media en Europa del total del fango generado, algunos ejemplos son: Dinamarca con porcentajes de incineración del 24% del fango producido, Francia el 20%, Bélgica el 15%, Alemania el 14%, Estados Unidos el 25% y Japón el 55% (Fytili y Zabaniotou, 2008).

- *Combustión*. Se lleva a cabo en hornos a elevadas temperaturas, es de carácter exotérmico y genera la problemática de evaporación de potenciales contaminantes, liberación de metales pesados y emisión de dioxinas y furanos, NO_x, N₂O, SO₂, HCl, HF y C_xH_y (Fytili y Zabaniotou, 2008).

- *Oxidación húmeda*. Se realiza a temperaturas de entre 150 y 330°C y presiones de 1 a 22 MPa con oxígeno sintético o atmosférico. Los productos son CO₂, H₂O y N₂. Se lleva a cabo en dos etapas: la primera (sub-crítica) a presiones de 10 MPa y la segunda (supercrítica) a presiones de 21,8 MPa. Un ejemplo de EDAR en la que se aplica este tipo de tratamiento se ubica en Apeldoorn, Holanda (Fytli y Zabaniotou, 2008).

- *Pirólisis*. Se define como un proceso termo-químico que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, normalmente en presencia de nitrógeno, en el cual la materia orgánica del fango por efecto del calor (300-900°C) se transforma en una mezcla líquida de hidrocarburos, gases combustibles, residuos secos de carbono y agua. Los gases combustibles pueden servir para accionar motores diésel o generar electricidad (Fytli y Zabaniotou, 2008).

- *Gasificación*. Consiste en una serie secuencial de procesos químicos y térmicos para transformar el contenido de carbono del fango en combustible gaseoso en una atmósfera reductora. Teóricamente, los residuos orgánicos con una humedad de entre el 5 y el 30% tienen el potencial de convertirse en biocombustibles (Fytli y Zabaniotou, 2008). Actualmente, este proceso es energéticamente auto-sostenible. La electricidad como fuente energética tiene ventajas como su elevado valor económico, fácil distribución y adaptación al mercado. Además, desde Europa se incentiva con 0,1€ por kWh generado a partir de fuentes renovables. Sin embargo, los combustibles gaseosos tienen asociada una potencial peligrosidad y no todos los biocombustibles se gasifican de manera satisfactoria; en este aspecto influyen: superficie, tamaño, forma, humedad, materia volátil y el contenido en carbono (Fytli y Zabaniotou, 2008).

Las cenizas resultantes de los diferentes procesos de incineración, pueden ser transportadas a vertederos o incluso utilizados para mejorar las propiedades de materiales utilizados en construcción, como el cemento por ejemplo (Fytli y Zabaniotou, 2008).

I.2.2. Tratamientos físico-químicos

Para la reducción de fango también se aplican tratamientos físico-químicos, normalmente generando lisis celular como pretratamientos complementarios a reducciones biológicas, principalmente. Los procesos más comúnmente empleados son: adición de ácidos o álcalis, ozonización, ultrasonidos o cloración. Algunas de estas herramientas de reducción aún se encuentran en fase de planta piloto.

- *Adición de álcalis.* La adición de compuestos alcalinos como NaOH, mejoran los posteriores tratamientos de digestión anaerobia. De hecho, la combinación de este tratamiento junto con la aplicación de electrólisis (descomposición por la aplicación de corriente eléctrica a la disolución), provoca la solubilización de ciertos sólidos y reduce en torno a un 20% el volumen de fango (Zhen et al., 2014).

- *Ultrasonido.* El efecto físico de rotura provocado por las ondas aplicadas mediante sonicación, provoca la desintegración de los flóculos del fango, la desinfección del mismo y la solubilización de partículas orgánicas; lo cual permite que los posteriores procesos de reducción mediante digestiones biológicas, sean más efectivos (Chu et al., 2001).

- *Ozonización.* Consiste en la aplicación de ozono (O_3) sobre el fango activo. Este tratamiento no produce un claro incremento en la calidad del efluente, sin embargo, mejora las propiedades de sedimentabilidad del fango y previene la acumulación de partículas inorgánicas. En consecuencia reduce la producción de fango en exceso. Sin embargo, es un tratamiento de un elevado coste económico (Khursheed y Kazmi, 2011; Yasui et al., 1996; Deleris et al., 2002; Chu et al., 2009).

- *Cloración.* Una alternativa al proceso costoso de ozonización es la cloración (adición de Cl_2). Este proceso, mejora la calidad del efluente y actúa como desinfectante; en la actualidad se están realizando ensayos de velocidad de reducción del fango y se ha determinado que puede generarse un 65% menos de fango en exceso aplicando este tratamiento previamente a la digestión aerobia. Sin embargo, las propiedades de sedimentabilidad empeoran debido a la solubilización de compuestos en suspensión; lo cual puede solventarse mediante la utilización de reactores de membrana (Saby et al., 2002; Khursheed y Kazmi, 2011; Pandey y Singh 2014).

I.2.3. Tratamientos biológicos

Entre el 50 y el 60% del coste operacional de una EDAR se debe al procesamiento del fango que se genera. Por lo tanto, en la última década se ha incrementado el interés en técnicas que disminuyan la producción de este residuo o permitan su reducción de manera menos costosa. Se han implementado técnicas mecánicas, químicas y físicas pero éstas se centran en reducir este residuo sin una elevada revalorización. Por su parte, métodos biológicos como la generación de metano o el crecimiento de depredadores pueden proporcionar subproductos de valor que rentabilicen el proceso de depuración de aguas residuales (Hendrickx et al., 2010a).

La oxidación biológica de la materia orgánica y eliminación de nutrientes es la manera más económica y viable de realizar el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, es necesaria que la generación de fangos en exceso sea lo menor posible y obtener una vía para su eliminación. El sistema biológico involucrado en la degradación de materia orgánica es complejo: virus, bacterias, protozoos, metazoos (como oligoquetos o helmintos), etc. Además de reducir el contenido en carbono, influyen en la nitrificación y desnitrificación (Khursheed y Kazmi, 2011).

El rendimiento de síntesis de fango está comprendido entre 0,4 y 0,5 kg SSV/kg de DQO consumida. Por tanto, el poder de consumo a través de la digestión del fango es superior al 57% (Khursheed y Kazmi, 2011).

Para la reducción del fango, la tendencia actual es la implantación de sistemas biológicos frente a los métodos físico-químicos y mecánicos ya que suelen ser más económicos y sostenibles. Sin embargo, los mecanismos de los procesos de reducción biológicos son menos conocidos, controlables e implantables a nivel industrial, en la actualidad. El tipo de tratamiento utilizado influye notablemente en la calidad del efluente (Khursheed y Kazmi, 2011).

La oxidación de la materia orgánica realizada por organismos vivos, se produce mediante mecanismos de bio-oxidación, los cuales se pueden clasificar en: lisis celular (alta oxigenación), desacoplamiento metabólico (OSA), mantenimiento metabólico (MBR –figura I.4B-) y eco-manipulación (depredación).

- *Lisis celular (alta oxigenación)*. La lisis celular se produce por rotura de la membrana celular causando la muerte y liberación de los componentes celulares en una solución (lisado). Esto produce que la carga orgánica, los metabolitos microbianos y el carbono sean liberados como producto de la respiración (CO_2 y H_2O) reduciendo por tanto la producción de biomasa en el fango. Es decir, las células vivas degradan el lisado de células desintegradas a través del proceso respiratorio (Khursheed y Kazmi, 2011).

La efectividad de este mecanismo de reducción queda demostrado en trabajos experimentales como los mostrados por Mason y Hamer (1987) que comparan el crecimiento de la biomasa de *Klebsiella pneumoniae* con y sin aplicación de lisis celular siendo de 0,33 g de biomasa/g de DQO frente a 0,56 g de biomasa/g de DQO, respectivamente (Khursheed y Kazmi, 2011).

La implantación de una unidad separada del proceso para la digestión aerobia de fango en exceso lleva años utilizándose mediante sistemas de: fangos activos convencional (FAC), oxígeno de alta pureza y digestión auto-térmica (Khursheed y Kazmi, 2011). Abbasi et al. (2000) demostraron que aumentando la concentración de oxígeno de 2 a 6 mg/L, la reducción de fango se incrementaba hasta en un 25% (Abbasi et al., 2000; Khursheed y Kazmi, 2011).

Sin embargo, la aireación de volúmenes enormes de agua residual y fango tiene como inconveniente una baja rentabilidad económica; de hecho, Low y Chase (1999) estiman que el coste de la aireación es del 50% del total del coste energético del proceso de depuración (Khursheed y Kazmi, 2011; Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b).

- *Desacoplamiento metabólico*. En función de las condiciones de operación, con temperaturas adecuadas y en presencia de ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos, los microorganismos ajustan el nivel de energía de su metabolismo a catabolismo o anabolismo (Low y Chase, 1999a). La aplicación de ciclos alternos de aerobiosis-anaerobiosis produce una disociación entre las rutas catabólicas y anabólicas. Así, parte de la energía en forma de ATP obtenida por la degradación de la materia orgánica vía catabólica no se emplea para el crecimiento celular en condiciones de anabolismo, sino que se pierde como calor o en reacciones no asociadas al crecimiento; lo cual provoca una disminución en el fango generado en exceso. Existen varias estrategias basadas en el desacoplamiento metabólico que han permitido una reducción notable en la cantidad de fangos en exceso generado (Khursheed y Kazmi, 2011).

Las dos opciones más comunes para obtener un desacoplamiento energético son: incrementar el ratio sustrato inicial respecto a la biomasa inicial (S_0/X_0) o aplicar un proceso OSA (del inglés “oxic-settling-anaerobic”) (Khursheed y Kazmi, 2011). El *proceso OSA* consiste en realizar ciclos alternantes de condiciones anaerobias y aerobias reduciendo la producción de fango debido al desacoplamiento entre catabolismo y anabolismo; favoreciendo el primero frente al segundo. Los microorganismos aerobios acumulan energía en forma de ATP en presencia de O_2 , y este se consume en condiciones anaerobias. Además estos ciclos terminan produciendo la muerte celular generando lisados de microorganismos y liberándose su contenido intracelular; que en última instancia es fácilmente degradable por otros

microorganismos o mediante enzimas extracelulares (Khursheed y Kazmi, 2011; Saby et al., 2003).

- *Mantenimiento del metabolismo*. Los microorganismo capturan energía en forma de ATP mediante la oxidación biológica; esta energía la utilizan para el mantenimiento celular en primer lugar y para la síntesis celular de biomasa seguidamente (Khursheed y Kazmi, 2011). Si el fango tiene una larga edad, se incrementa el consumo de energía de los microorganismos para su mantenimiento en detrimento de síntesis de nueva biomasa. Es decir, se disminuye la generación de fango (Khursheed y Kazmi, 2011).

- *Eco-manipulación (depredación)*. El principio en el que se basa la utilización de microfauna para reducir el fango en exceso es que la materia y la energía se reducen y disipan a lo largo del flujo de la cadena alimentaria (Khursheed y Kazmi, 2011). Teóricamente, hay pérdida energética en cada transición de la cadena alimentaria en forma de CO₂ y agua (Buys et al., 2008).

La cadena trófica en el fango se compone de bacterias, protozoos, metazoos y larvas de insectos. Las bacterias saprófitas constituyen los consumidores primarios y los metazoos y protozoos se alimentan de bacterias mediante relaciones de depredador-presa. Lo cual fue observado inicialmente por Curds y Cockburn (1970). De hecho, diversos autores han visto potencial como herramienta biotecnológica a la utilización de depredadores para manipular el ecosistema (Khursheed y Kazmi, 2011; Wei et al., 2009).

En la tabla I.6 se recogen las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos mecanismos de reducción de fango.

Tabla I. 6. Ventajas e inconvenientes de las alternativas de reducción de fango. Modificada de (Khursheed y Kazmi, 2011).

Proceso	Ventajas	Inconvenientes	Reducción de fango (%)	Referencias principales
Alta oxigenación	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado grado de estabilización - Estable y fácil de implementar - Se puede reprimir el crecimiento de organismos filamentosos 	<ul style="list-style-type: none"> - Imposibilidad de mantener elevadas concentraciones de sólidos en el líquido mezcla - Mecanismo poco conocido - Elevado consumo de energía 	0-66%	(Abbassi et al., 2000) (Ichinari et al., 2008)
Oxígeno puro	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo de hongos filamentosos - Posibilidad de mantener una elevada carga de sólidos en el reactor - Favorece la sedimentación y el espesamiento - Operación estable 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja eficacia - Mecanismo poco conocido - Elevados costes de aereación 	54-60%	(Boon y Burgess, 1974)
OSA	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso sencillo introduciendo un reactor anaerobio en el sistema FAC - Control de organismos filamentosos - Mejoras en la eliminación de DQO y sedimentación del residuo - No son necesarios procesos químicos ni físicos complementarios 	<ul style="list-style-type: none"> - Son necesarias investigaciones que establezcan las condiciones óptimas de operación 	38-54%	(Chen et al., 2001a) (Chen et al., 2001b) (Chen et al., 2003) (Saby et al., 2003)

Continuación de la Tabla I. 6.

Proceso	Ventajas	Inconvenientes	Reducción de fango (%)	Referencias principales
S_0/X_0	<ul style="list-style-type: none"> - No se aplican productos químicos - Reactores de bajo volumen 	<ul style="list-style-type: none"> - No se ha aplicado actualmente - Baja calidad del efluente - Necesidad de tratamientos posteriores del efluente - Elevados costes de inversión y operación 	70%	(Chudoba et al., 1991; Liu, 2000)
Depredación	<ul style="list-style-type: none"> - Actualmente existen numerosas investigaciones al respecto - Sostenibilidad ambiental 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapacidad de controlar el crecimiento de los depredadores, especialmente en reactores - Cinética no definida 	12-75%	(Lee y Welandar, 1996) (Wei et al., 2003) (Wei et al., 2009) (Moussa et al., 2005)

I.3. Eco-manipulación con depredadores

I.3.1. Antecedentes de utilización de depredadores

La reducción de fango producido en las EDARs, mediante el proceso de depredación, se ha presentado en varios trabajos como una posible solución a la reducción de la biomasa que se genera; eliminando parcialmente la materia orgánica.

En el proceso de mineralización, se produce una oxidación de materia orgánica hasta CO_2 , H_2O , compuestos nitrógenados y fosfatados. Cuando un organismo se alimenta de otro, la biomasa neta decrece considerablemente (Rensink y Rulkens, 1997).

En la figura I.8 se muestra la fauna presente en el fango que, principalmente, está formada por protozoos y, ocasionalmente, metazoos. Los protozoos se dividen en nadadores libres, reptantes y sésiles. Por otra parte, los metazoos presentes suelen ser rotíferos y nematodos aunque puntualmente también puede haber eclosión de oligoquetos: *Aelosomatidae* y *Naididae*. Por otra parte, los insectos ocupan la cúspide de la pirámide pero su influencia en el ecosistema no es relevante por su baja representatividad poblacional (Rensink y Rulkens, 1997).

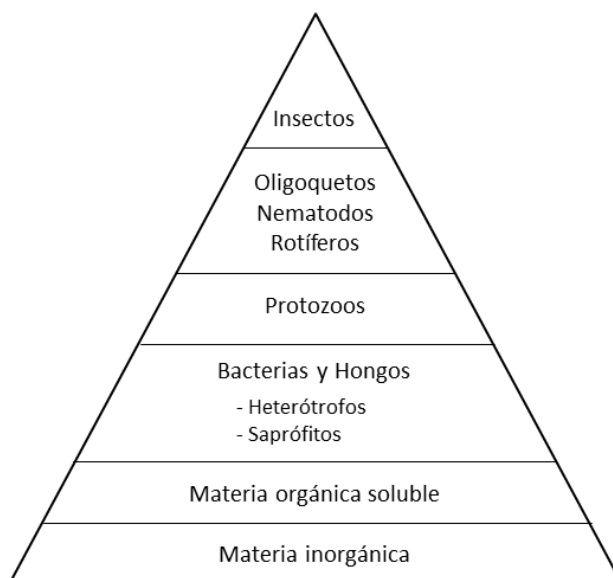


Figura I. 8. Cadena trófica de la microfauna del fango activo. Modificado de Rensink et al. (1997).

En el ecosistema del fango existen factores bióticos como son la relación presa-depredador o la competencia por fuentes de alimento comunes; también hay factores abióticos como: estructura física del hábitat, pH, O₂, Ca, salinidad, sustancias tóxicas, etc. El conjunto de estos factores condicionará qué organismos predominan en cada etapa del proceso de depuración (Rensink y Rulkens, 1997).

La presencia de depredadores suprime el crecimiento de bacterias dispersadas por lo que favorece la formación de flóculos quedando por tanto la mayor porción del fango inaccesible a los depredadores. Además, la mineralización que llevan a cabo los depredadores produce que en el efluente haya una liberación de nitratos y fosfato (Lee y Welander, 1996; Khursheed y Kazmi, 2011).

Sin embargo, es necesario un mayor entendimiento de la ecología del sistema para controlar el proceso de utilización de protozoos y metazoos y aplicarlo a gran escala con la finalidad de reducir el fango de las EDARs. De hecho, este desconocimiento, ha propiciado que la experimentación utilizando depredadores para la reducción de fango, se haya centrado más en oligoquetos frente a protozoos y metazoos (Khursheed y Kazmi, 2011).

- *Depredación con rotíferos*. Los rotíferos son metazoos que se nutren de partículas en suspensión, capaces de alimentarse de varias veces el peso de su cuerpo por día (Lapinski y Tunnacliffe, 2003).

- *Depredación con hongos filamentosos*. La actividad de hongos filamentosos es otra posibilidad de eco-manipulación para evitar el crecimiento de la biomasa del fango; ya que los hongos son organismos saprófitos, es decir, se nutren de la materia orgánica muerta que es degradada. Las posibilidades que ofrecen son: reducción de biofloculación, sólidos y patógenos junto con una eliminación y degradación de compuestos tóxicos (Khursheed y Kazmi, 2011; More et al., 2010).

Una de las ventajas de utilizar micro-hongos frente a bacterias es que necesitan una baja cantidad de oxígeno para realizar sus reacciones metabólicas por lo que disminuye los costes de aireación. Además, son capaces de degradar sustratos más complejos que las bacterias y ciertas variedades de hongos producen efectos beneficiosos en aquellos fangos cuya finalidad sea su utilización en fertilizantes (Khursheed y Kazmi, 2011).

Sin embargo, la investigación con hongos filamentosos para el tratamiento de fango no está bien establecida y se limita a frascos agitados. Por tanto, para considerar a los hongos filamentosos como una herramienta aplicable, aún son necesarios exhaustivos estudios acerca de tiempos de incubación, temperatura, concentración de oxígeno, pH, agitación, concentración de ST y otros parámetros de operación (Khursheed y Kazmi, 2011).

1.3.2. Depredación con oligoquetos

Como se ha señalado anteriormente, la utilización de metazoos, concretamente oligoquetos, puede ser de utilidad para reducir la producción de biomasa mediante una mineralización del fango, cuyo proceso consiste en convertir el carbono orgánico en CO₂. Otra ventaja de la presencia de oligoquetos es la mejora de las propiedades de estabilidad, espesamiento y filtrado del fango. Sin embargo, como desventajas de esta mineralización, se incrementa la concentración de nitratos y fosfatos; también se reduce el proceso de nitrificación generado por los biofilms bacterianos en el proceso aerobio. Por otra parte, la presencia de estos oligoquetos es difícilmente controlable bajo las condiciones de operación a nivel industrial (Rensink y Rulkens, 1997).

Los oligoquetos son una subclase del filo Annelida e incluye algunos gusanos terrestres. Los oligoquetos en el proceso de depuración aparecen espontáneamente de manera puntual, sin embargo, la dificultad reside en mantener estable una elevada densidad de población para estabilizar el proceso (Hendrickx et al., 2010a). De hecho, se han realizado ensayos con diferentes poblaciones del filo Annelida. De mayor a menor presencia en los fangos de las EDARs: *Nais spp.*, *Aeolosoma hemprichi*, *Pristina aequiseta*, *Aeolosoma variegatum*, *Chaetogaster diastrophus* y *Aeolosoma tenebrarum* (Elissen et al., 2008).

Liang et al. (2006), utilizaron el oligoqueto *Aeolosoma hemprichi* consiguiendo una reducción de fango relativa de entre el 39 y el 65% (Liang et al., 2006a; Liang et al., 2006b). Huang et al. (2007), realizaron experimentos similares utilizando el oligoqueto *Tubifex tubifex* (Khursheed y Kazmi, 2011). Y Song y Chen (2009), llevaron a cabo estudios con *A. hemprichi* en discontinuo y continuo, determinando la velocidad específica de crecimiento (μ) y correlacionando la reducción de fango con la velocidad de crecimiento y densidad de *A. hemprichi* (Song y Chen, 2009).

Por otra parte, Wei et al., correlacionan la reducción de fango con la densidad de microfauna pero obvia otros factores que pueden influir notablemente como son la temperatura, clases bacterianas, tiempo de residencia y el ratio sustrato/biomasa. De hecho, luxmy et al., (2001) sugieren que los metazoos no pueden reducir la producción de fango en un tanque aireado. Sin embargo, Elissen et al. y Hendrickxs sí determinaron que la microfauna puede reducir la producción de fango. Estas corrientes contradictorias se deben principalmente a las dificultades de un método efectivo que determine la contribución exacta de la microfauna a la velocidad de reducción de fango (Khursheed y Kazmi, 2011).

Uno de los antecedentes más relevantes, se ubica en 1994 cuando Ratsak estudió el comportamiento de oligoquetos en una EDAR durante más de un año, observando la predominancia de *Nais-elinguis* frente a *Pristina sp.* y *Aeolosoma hemprichicci*. La presencia de oligoquetos fue ocasional e inestable pero se pudo

correlacionar su presencia con una reducción de fango de hasta el 50%. Sin embargo, cómo mantener estable la población de oligoquetos es el principal problema para su aplicación industrial (Rensink y Rulkens, 1997).

En base a las observaciones previas como las de Ratsak, se realizó uno de los primeros trabajos experimentales utilizando oligoquetos para la reducción de fango. Rensink y Rulkens, en 1997, inocularon oligoquetos *Tubificidae* en sistemas de filtros por goteo en un proceso que duraba entre 10 y 14 días. El resultado que obtuvieron fue una reducción de DQO de entre el 18 y el 67% en el licor mixto de una planta de tratamiento de fango activo procedente de la industria cervecera holandesa. Además, observaron que el proceso de nitrificación no se veía afectado; a pesar de que se incrementaba la concentración de nitrato y fosfato. La utilización de *Tubifex sp.* permite un control más sencillo frente a otros oligoquetos (Rensink y Rulkens, 1997).

El sistema que utilizaron Rensink y Rulkens se basaba en la observación de un crecimiento espontáneo de *Tubifex sp.*, *Nais-elinguis* y *Aeolosoma hemprichii* en los materiales de soporte; ya que si se utilizaban estos soportes, se disminuía la DQO en el licor mixto debido al crecimiento de estos oligoquetos (Rensink y Rulkens, 1997).

Más recientemente, Buys et al. presenta un test simple para evaluar los rendimientos de reducción de fango con el oligoqueto *Lumbriculus variegatus*. También se han utilizado oligoquetos acuáticos que aparecen en las propias EDARs y presumiblemente se nutren de bacterias como fuente de alimento: *Tubificidae*, *Naididae* y *Aeolosomatidae*. Entre el 20 y el 40% del fango es convertido en biomasa de oligoqueto. El test es llevado a cabo a nivel de laboratorio en placas y matraces. Sin embargo, aún no se ha puesto en práctica ninguno de estos sistemas (Buys et al., 2008).

Este test no utiliza pre-tratamientos de ningún tipo por lo que sería trasladable el resultado a lo que ocurriría en la planta de tratamiento. En contraposición, Liang et al., esterilizan el fango previamente y esto podría generar lisis bacteriana que modifique los rendimientos (Liang et al., 2006b; Buys et al., 2008).

Respecto al contenido en cenizas (carbono inorgánico), aumenta de un 18% a un 25% aproximadamente. Los nitratos y nitritos van desapareciendo y el pH se incrementa a lo largo del cultivo de oligoquetos. Esta desnitrificación se debe a la falta de oxígeno en la capa de fango para simular un medio sedimentado (Buys et al., 2008).

A nivel de planta piloto, se han realizado ensayos utilizando oligoquetos acuáticos bentónicos para la reducción de fango; el sistema es en continuo con un soporte malla en reactores de 125 m³. El porcentaje de reducción de SSV en el reactor con oligoquetos es del 50% aproximadamente en las condiciones más óptimas. Y la reducción de SST fue del 14% sin oligoquetos, lo cual ha confirmado que la actividad

metabólica de estos depredadores es la principal causa de reducción de materia orgánica (Tamis et al., 2011). Estos datos de reducción son semejantes a los que obtuvieron otros autores en cultivos con el oligoqueto *L. variegatus* (Hendrickx et al., 2009b). Además, la velocidad máxima de reducción de fango sin oligoquetos mostró valores de $0,12 \text{ d}^{-1}$ siendo al menos del mismo orden a las velocidades de 0,3 y $0,4 \text{ d}^{-1}$ publicados en otros trabajos previos (Henze et al., 1999).

Elissen y Hendrickx son dos de los autores más relevantes de la última década en la utilización de oligoquetos para la reducción de fango.

Elissen diseñó un reactor con el oligoqueto sésil *Lumbriculus variegatus* inmovilizado para compararlo con un sistema sin oligoquetos. Observó que se triplicaba la reducción de fango en presencia de este depredador (75% de reducción de ST). En otros sistemas previos, sin inmovilización, se observaron menores porcentajes de reducción (entre el 10 y el 50% de ST). Además, este sistema permite separar el fango no consumido, la biomasa de los oligoquetos y las heces (Elissen et al., 2006).

Por su parte, Hendrickx ha utilizado *L. variegatus* para estudiar los parámetros de operación y diseñar un reactor con la adecuación del diseño, tamaño, temperatura, luz, concentraciones de amonio, oxígeno, etc. Este oligoqueto se alimentó de fango secundario que había sido previamente filtrado (Hendrickx et al., 2009a).

El diseño del reactor fue modificado por el propio Hendrickx inmovilizando los oligoquetos en un soporte vertical; previamente también realizó estudios con una configuración horizontal. Esto permitía una mejor aireación y recolección de las heces para su separación; además, se comprobó una mayor velocidad de crecimiento de la población de *L. variegatus* ($0,014 \text{ d}^{-1}$). Sin embargo, estas condiciones de cultivo son difícilmente escalables a nivel industrial (Hendrickx et al., 2011).

Con respecto a la reducción de fango, en los experimentos en discontinuo con *L. variegatus* se observó una reducción de entre el 16% de SSV y el 11% de SST. También se determinó que la densidad poblacional de oligoquetos y las propiedades nutricionales del fango se consideran factores críticos (Hendrickx et al., 2011).

La reducción obtenida en sistemas en continuo por el oligoqueto *L. variegatus* es del 21% de los SST y el 26% de los SSV, datos lejanos a los descritos en trabajos previos con reducciones de entre el 36 y el 75% de los SST. La reducción del nitrógeno es del 37% ya que es utilizado el oligoqueto principalmente para la formación de biomasa en forma de proteínas. Se incrementan los fosfatos solubles (10%) y el amonio (5%) (Hendrickx et al., 2010a).

Hendrickx determinó y comparó la velocidad de degradación del fango para un reactor con *L. variegatus* inmovilizado ($0,023 \text{ d}^{-1}$) y otro reactor sin inmovilizar ($0,018 \text{ d}^{-1}$). Sin embargo, la velocidad de crecimiento de este organismo fue sensiblemente mayor para oligoquetos libres ($0,026 \text{ d}^{-1}$ en placa de Petri) frente a oligoquetos inmovilizados ($0,010 \text{ d}^{-1}$). Además, quedó demostrada la necesidad de una aireación suplementaria para el crecimiento de los oligoquetos (Hendrickx et al., 2010b).

Además, Hendrickx realizó experimentos en un sistema continuo con *L. variegatus* inmovilizado determinando una velocidad de crecimiento de $0,013 \text{ d}^{-1}$ y un rendimiento de conversión de $0,13 \text{ g peso seco/g SSV}$ digeridos por los oligoquetos. Se obtuvo una reducción de entre el 16 y el 26% de TSS (equivalente al 22 y 30% de SSV) (Hendrickx et al., 2009b).

La reducción media de SST está entre 16-26% (Hendrickx et al., 2009b); resultados menores a los reportados previamente: 75% por Elissen 2006 (Elissen et al., 2006) y 36% de reducción de SST por Hendrickx (Hendrickx et al., 2009a). La principal explicación que se aporta es que las aguas residuales tienen una composición heterogénea en cuanto a las bacterias activas y la cantidad de materia orgánica disponible; esto afecta drásticamente al rendimiento del proceso. De hecho, observan variaciones dentro del mismo sistema de depuración en distintos meses del año (Hendrickx et al., 2009b).

Para la implantación de un proceso integrado en las EDARs, se ha estudiado la combinación de un sistema de dos etapas: reactor con oligoquetos (primera etapa) y digestión anaerobia (segunda etapa). También se ensayó con el mismo sistema en orden inverso, es decir, primero una digestión anaerobia y después el cultivo de oligoquetos; el resultado fue una reducción del 50 y el 42% de los SST, respectivamente. Sin embargo, la producción de metano en este segundo sistema duplicó al primero. Esto ha permitido determinar que la biomasa de oligoqueto es fácilmente digerida anaerobiamente, especialmente a 35°C y altas concentraciones de amonio que resultan tóxicas para el gusano (Hendrickx et al., 2010a).

Otro ejemplo de sistema integrado, ha sido experimentado por J. Tamis et al., mostrando una reducción del 65% de los SST (sólidos en suspensión totales) combinando un sistema de dos etapas: en la primera se produce la depredación del fango mediante el cultivo del oligoqueto acuático *Aulophorus furcatus* y en la etapa posterior se realiza un tratamiento anaerobio en el cual se genera metano a partir del carbono presente en el fango (Tamis et al., 2011).

En la tabla I.7 se recoge la comparativa entre la utilización de diversos tipos de microfauna para la reducción de fango.

Tabla I. 7. Comparativa entre diferentes microfaunas empleadas para la reducción de fango de las EDARs.

Organismo	Ventajas	Inconvenientes	Reducción de fango	Referencias principales
Protozoos	- Crecen espontáneamente en fangos activos por lo que es un hábitat adecuado para su crecimiento	- Desconocimiento de su cultivo en reactores - Se nutren de bacterias dispersadas por lo que los flóculos son inaccesibles	-	(Khursheed y Kazmi, 2011)
Rotíferos (<i>L. rotifera</i>)	- Incremento en la reducción de nitrógeno	- Baja prevalencia de la población de rotíferos - Difícil de controlar su cultivo	-	(Lapinski y Tunnacliffe, 2003)
Hongos filamentosos	- Reducción de biofloculación, sólidos, patógenos y compuestos tóxicos - Bajo coste de aireación - Degradación de sustratos complejos - Propiedades positivas para fertilizantes	- Bajo conocimiento del cultivo a escala piloto e industrial	-	(Khursheed y Kazmi, 2011)
Oligoqueto (<i>A. hemprichi</i>)	- Aparece espontáneamente en fangos activos - Correlación de la reducción de fango con la velocidad específica de crecimiento	- Descontrol de su cultivo en fango - Descontrol de su cultivo en fango	39-65% -	(Liang et al., 2006a; Liang et al., 2006b) (Song y Chen, 2009)
Oligoqueto (<i>Nais-elinguis</i>)	- Correlación de la presencia del oligoqueto con la reducción de fango	- Descontrol de su cultivo en fango. Inestabilidad	< 50%	(Rensink y Rulkens, 1997)
Oligoqueto (<i>Tubifex sp.</i>)	- Cultivo más controlado que otros oligoquetos	- Sistema de filtros por goteo con soportes para los oligoquetos	18-67% de DQO	(Rensink y Rulkens, 1997)
Oligoqueto (<i>A. furcatus</i>)	- Sistema integrado en dos etapas: depredación más digestión anaerobia	- Complejidad del sistema	65% de SST	(Tamis et al., 2011)

Continuación de la Tabla I.7.

Organismo	Ventajas	Inconvenientes	Reducción de fango	Referencias principales
Oligoqueto (<i>L. variegatus</i>)	- Test simple para evaluar rendimientos de reducción - Sin pretratamientos	- Estudios a nivel de laboratorio (placas y matraces)	-	(Buys et al., 2008)
	- Ensayos a nivel de planta piloto (125 m ³)	- Inestabilidad de los cultivos en reactores	50% de SSV	(Tamis et al., 2011)
	- Velocidad máxima de reducción de fango de 0,12 d ⁻¹	- Necesidad de inmovilización.		
	- Separación de biomasa, fango no consumido y heces que facilitan el estudio	- Necesaria inmovilización (sistema difícilmente escalable) - Consideración de las heces y su sedimentación como parte de la reducción	75% de SST	(Elissen et al., 2006)
	- Cultivo en suspensión escalable a nivel industrial	- Imposibilidad de separar las heces del resto de componentes	10-50% de ST	(Elissen et al., 2006)
	- La inmovilización permite menor gasto en aireación y recolección de las heces	- Inmovilización (sistema difícilmente escalable) - Discontinuo	16-11% de SST	(Hendrickx et al., 2011)
	- Continuo - Mayor rendimiento de reducción que discontinuo y fácilmente escalable.	- Inmovilización (sistema difícilmente escalable)	16-26% de SST	(Hendrickx et al., 2009b) (Hendrickx et al., 2010a)
	- Sistema integrado en dos etapas: depredación más digestión anaerobia	- Complejidad del sistema	42-50% de SST	(Hendrickx et al., 2010a)

Para concluir, y como se ha descrito anteriormente, los oligoquetos pueden alimentarse de fango reduciendo este residuo. Además, su biomasa puede ser potencialmente de interés ya que está compuesta principalmente por proteína, pequeña fracción de grasa, azúcar y cenizas. De hecho, Elissen et al., (2010) proponen algunas aplicaciones de la biomasa de *L. variegatus* como son: alimento para animales, producción de enzimas, materia grasa, ácidos grasos, azúcares, aminoácidos y proteínas o la transformación de la biomasa en fertilizantes, biogás, biodiésel, etc. (Elissen et al., 2010). Por tanto, la utilización de depredadores puede ser una alternativa efectiva para la reducción de fango. Sin embargo, aún no están establecidos los parámetros que permitan un control robusto sobre los sistemas de depredación y, en consecuencia, es necesario continuar trabajando en este sentido.

I.4. El nematodo *Caenorhabditis elegans*

I.4.1. Definición y clasificación

El organismo *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre (no parásito) que mide aproximadamente 1 mm de longitud y se alimenta de bacterias. Taxonómicamente, *C. elegans* es un metazoo que pertenece al filo Nematoda, a la familia Rhabditidae.

Los nematodos son uno de los filos más amplios encontrados en la naturaleza con unas 25.000 especies con características comunes: son asegmentados, fusiformes de cuerpo cilíndrico y alargado, tienen simetría bilateral y poseen diversos tejidos, como epitelio, tejido muscular y un sistema nervioso relativamente complejo. Por otra parte hay diferencias notables entre especies respecto al tamaño o el hábitat (formas de vida acuática y terrestre); además, existen nematodos de vida libre, como *C. elegans*, o parásitos como *Brugia malayi* (Hope, 1999; Ghedin et al., 2009).

I.4.2. *C. elegans* como organismo modelo

El nematodo *C. elegans* fue aislado de detritos de hongos por Warwick Nicholas en Bristol (Inglaterra). Casi una década más tarde, en 1965, Sydney Brenner identificó que este organismo podría ser un buen animal modelo y cultivó el primer *C. elegans* en laboratorio (estirpe denominada N2) que, de hecho, se sigue utilizando en la actualidad (Sterken et al., 2015). Sydney Brenner fue pionero usando este animal en estudios biomédicos aplicándolo en sus investigaciones sobre diferenciación celular, muerte programada y genética del desarrollo. A su vez, desarrolló la tecnología para trabajar con este organismo y generó una escuela de investigadores que han hecho de este animal uno de los organismos más populares en los laboratorios de biomedicina. Por todo ello, fue galardonado décadas más tarde con el premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2002. Cabe señalar que, previamente al trabajo de Brenner y de manera contemporánea, hubieron investigadores como Maupas, Honda, Nigon, Dougherty o Brun, que contribuyeron con sus observaciones al conocimiento de *C. elegans* aunque sus descripciones tuvieran un menor impacto (Nigon y Félix, 2017).

Desde los primeros trabajos de Sydney Brenner, se ha obtenido un enorme conocimiento sobre este nematodo; lo cual se refleja en las más de 24.000 citas que aparecen en la base de datos de biomedicina “PubMed” sobre este organismo (Pubmed, 2017). Durante este tiempo se han desarrollado numerosos protocolos para trabajar con este organismo destacando métodos para modificar su genoma o la expresión de genes, y protocolos para comprender sus procesos fisiológicos o su comportamiento. Esto ha permitido utilizarlo para imitar enfermedades humanas en

este organismo y así poder estudiarlas o buscar nuevos tratamientos (Riddle et al., 1997; Hope, 1999).

C. elegans como organismo modelo se ajusta a los requerimientos vitales mínimos comunes en todos ellos: un ciclo de vida corto y que se pueda manipular genéticamente.

Además, de cumplir estos requisitos, *C. elegans* posee otras ventajas importantes. La utilización de *C. elegans* en el laboratorio es económica, con un requerimiento mínimo de equipos se puede cultivar tanto en medio sólido como líquido usando como alimento la bacteria *Escherichia coli*, a temperaturas de entre 16 y 25°C. Su tamaño máximo en estadio adulto es de 1 mm de longitud y es transparente por lo que se pueden observar los órganos internos. La manipulación rutinaria puede hacerse con una lupa estereoscópica para visualizaciones *in vivo* y pueden manipularse individualmente usando un hilo de platino (Figura I.9). Además, es el único animal pluricelular que puede congelarse y mantenerse con vida por lo que existe una enorme colección de cepas sin necesidad de un mantenimiento continuo (Brenner, 1974).



Figura I. 9. Población de nematodos *C. elegans*, en diferentes estadios, alimentándose de *E. coli* en una placa de agar. Lupa Olympus SZX16 objetivo 1x; aumento 4x.

El ciclo de vida para *C. elegans* tiene una corta duración de 3 días, en los cuales el nematodo eclosiona a partir de un huevo, pasa por 4 estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) que vienen marcados por las mudas de su cutícula, hasta alcanzar la madurez sexual como adulto tras mudar la cutícula que tenía en el estadio L4 (Figura I.10). Los individuos adultos ponen entre 200 y 300 huevos durante 3 días y la edad media de *C. elegans* oscila entre 15 y 20 días (Wormbook, 2017). Además de los estadios mencionados, existe un estado larvario de resistencia denominado dauer que permite al nematodo sobrevivir en condiciones adversas como escasez de alimento o elevadas temperaturas (Albert y Riddle, 1988; Cassada y Russell, 1975; Sulston y Hodgkin, 1988).

También se induce dauer si existe una elevada densidad poblacional de nematodos mediante la detección de feromonas (Hu, 2007). La decisión de entrar en dauer se realiza durante los estadios L1 y L2, si durante ese periodo las condiciones ambientales no son favorables para la reproducción, la muda de L2 no se hace a L3 sino a dauer, en la que puede permanecer durante varios meses hasta que las condiciones ambientales cambien y sean favorables. Cuando esto ocurre se entra de nuevo en el ciclo reproductivo a través de una muda a L4 (Hu, 2007).

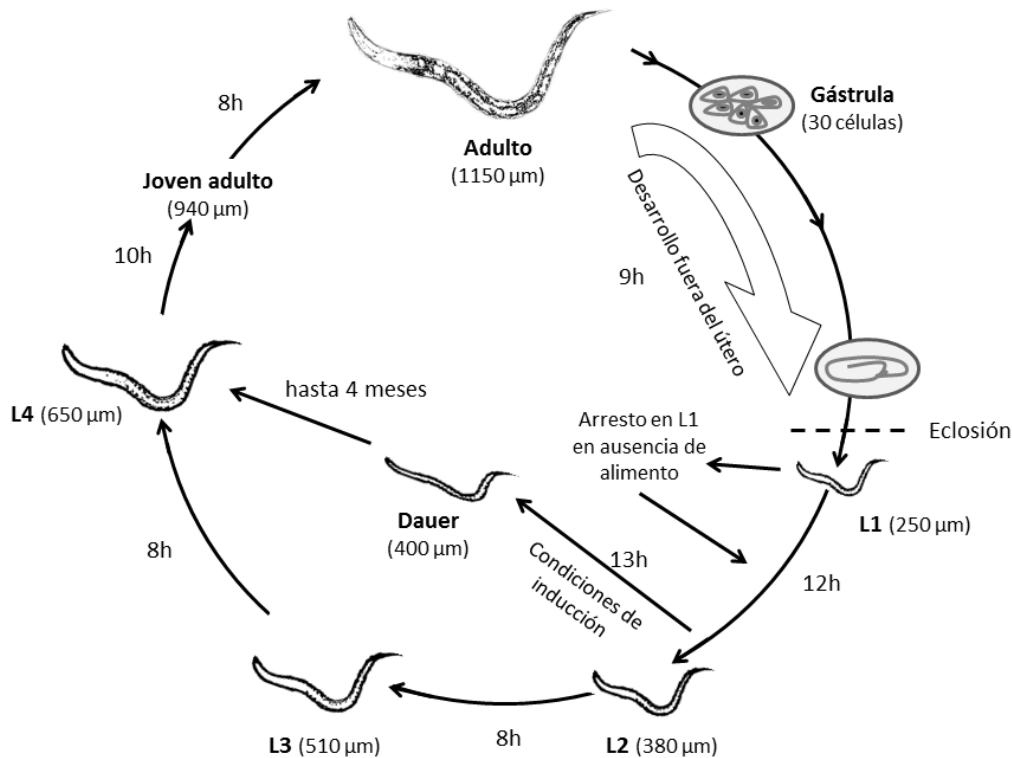


Figura I. 10. Ciclo de vida de *C. elegans* a 20°C de temperatura. Se observan los diferentes estadios del nematodo: huevo, L1, L2, L3, L4, jóvenes adultos y adultos. También se observa la larva dauer como estadio de resistencia. Modificado de WormAtlas, 2017.

La reproducción puede producirse mediante autofecundación o mediante la cópula con otro individuo. Para ello, *C. elegans* presenta dos formas sexuales: hermafroditas (XX) y machos (X0). La autofecundación es la principal vía de reproducción tanto en la naturaleza como en el laboratorio. La autofecundación permite conservar líneas genéticas puras y obtener un gran número de individuos. Los machos aparecen con una frecuencia inferior al 1% y se produce por la pérdida durante la autofecundación de uno de los cromosomas sexuales, por lo que cualquier cepa genera individuos machos en una baja frecuencia. La utilización de machos en los

laboratorios es una herramienta esencial para realizar cruces genéticos entre estirpes de interés.

En 1999, *C. elegans* se convirtió en el primer organismo pluricelular totalmente secuenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Años más tarde, con la secuenciación del genoma humano (2008), se determinó que existía una homología genética del 40% (Hodgkin y Herman, 1998) además de la conservación de rutas metabólicas como, por ejemplo, la ruta de la insulina, mecanismos de neurosecreción, apoptosis y muchas otras (Wormbook, 2017). El trabajo en biomedicina ha permitido la creación de numerosas herramientas técnicas y de biología molecular que han permitido, entre otras cosas, tener una enorme colección de cepas de este nematodo con deleciones de la mayoría de sus genes, cepas con expresión de la proteína verde GFP (“Green Fluorescent Protein”) en diferentes células y tejidos, genotecas de ARN de interferencia para generar reducciones de actividad de los genes de interés y protocolos para la obtención de organismos mutantes y transgénicos. Además, se han desarrollado técnicas que facilitan las mediciones de grasas, azúcares, proteínas, etc.

Todas estas características y conocimientos adquiridos hacen que *C. elegans* sea un organismo que permite llevar a cabo estudio genéticos, de longevidad, nutricionales, realizar ensayos de comportamiento, modificar las características bioquímicas o desarrollar estrategias terapéuticas utilizando modelos de enfermedades humanas. De hecho, *C. elegans* se utiliza como organismo modelo para diversas enfermedades como: alzhéimer, párkinson, diabetes, obesidad, envejecimiento, etc.

Debido a todas esas ventajas, existe una enorme comunidad de investigadores trabajando sobre este organismo en biomedicina; lo cual ha generado una importante fuente de recursos como: páginas webs (WormBase y Wormatlas), protocolos ya establecidos (WormMethods) y numerosas variedades de este organismo con diferencias en comportamiento, tamaño o composición bioquímica. Existen en torno a 16.000 variedades de este nematodo que están recogidas y disponibles para cualquier investigador en el Centro Genético de *Caenorhabditis* (CGC).

Es de destacar que a pesar de los enormes conocimientos, ventajas y herramientas desarrolladas sobre este nematodo en los últimos 40 años, no ha sido aplicado en bioprocesos a nivel industrial.

I.4.3. Contenido de materia grasa

El nematodo *C. elegans* acumula de forma natural lípidos en estructuras granulares de triglicéridos, lo cual ha convertido a este nematodo en un modelo para el estudio del metabolismo de las grasas y la obesidad (Riddle et al., 1997) (Figura I.11).

De hecho, se ha reportado bibliográficamente que este nematodo es capaz de acumular un alto porcentaje en materia grasa -36% del peso seco del nematodo- (Cooper y Van Gundy, 1970). El almacenamiento de grasa se lleva a cabo en las células del intestino y en células hipodérmicas. Debido a la transparencia de este nematodo, se pueden visualizar mediante tinciones como “Oil Red” y “Sudan Black” (Kimura et al., 1997; Ashrafi et al., 2003; Yen et al., 2010; Fouad et al., 2017).

La composición lipídica de *C. elegans* ha sido determinada por diversos autores mediante extracción de lípidos totales fraccionados en lípidos neutros y fosfolípidos y análisis mediante cromatografía de gases (Kniazeva et al., 2003; Satouchi et al., 1993; Watts y Browse, 2002). Los triglicéridos constituyen entre el 40% y el 55% del total de lípidos dependiendo de la dieta y el estadio del nematodo (Ashrafi, 2006). La fracción de fosfolípidos está constituida por glicerofosfolípidos etanolaminas (55%), glicerofosfolípidos colinas (32%), esfingomiélin (8%) y otros (cardiolipina, inositol y liso-glicerofosfolípidos). La abundancia relativa de estos fosfolípidos se ve influenciada por la temperatura de crecimiento (Satouchi et al., 1993; Tanaka et al., 1996).

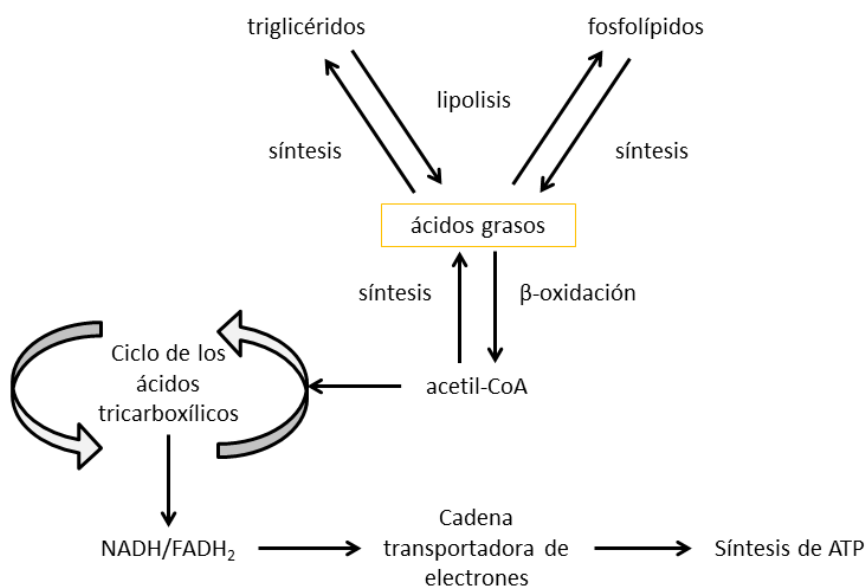


Figura I. 11. Descripción simplificada del metabolismo lipídico en *C. elegans*. Modificado de Wormbook, 2017.

De manera semejante a los mamíferos, *C. elegans* contiene un amplio rango de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (PUFAs) incluyendo ácido araquidónico (20:4n-6), ácido eicosapentanoico (20:5n-3) y también ácidos grasos de cadena ramificada (Kniazeva et al., 2003; Satouchi et al., 1993; Watts y Browse, 2002). Además, *C. elegans* contiene desaturasas y elongasas de PUFAs; por tanto, no es necesaria la suplementación dietaria de ácido linoleico (18:2n6) y linolénico (18:3n3) como ocurre en mamíferos (Brock et al., 2006; Wallis et al., 2002; Watts y Browse, 2002). Sin embargo, *C. elegans*, es auxótrofo para el colesterol; es decir, necesita la adición en pequeñas cantidades de este esteroide como precursor de hormonas derivadas del mismo (Kurzchalia y Ward, 2003).

El conocimiento que se tiene de las rutas del metabolismo lipídico en este organismo y la disponibilidad de herramientas para realizar modificaciones genéticas ha hecho que existan numerosas cepas que presentan alteraciones en la composición lipídica o en el contenido total. Algunas de estas cepas están disponibles en el repositorio de cepas CGC.

I.5. Posibles aplicaciones industriales del nematodo *C. elegans*

I.5.1. Producción de biomasa de nematodo

Elissen et al., (2010) proponen diversas aplicaciones para la biomasa de oligoquetos. Estas aplicaciones podrían extrapolarse para el nematodo *C. elegans* ya que, a pesar de ser un organismo modelo muy estudiado en biomedicina, no existen referencias bibliográficas de aplicaciones en la industria como pretende conseguir este trabajo de investigación. Es importante destacar que la fuente de alimento, condiciona las características y composición de la biomasa del nematodo.

La biomasa viva puede utilizarse como alimento para animales que no se incorporen a la cadena alimenticia (peces de acuarios, larvas de insectos, etc.); para alimentación de animales de consumo humano también podría utilizarse siempre y cuando el medio de cultivo sea considerado adecuado. Por otra parte, la biomasa muerta puede emplearse como alimento para animales, la producción de energía (biogás en los digestores anaerobios o incineración) y la aplicación como fertilizantes debido al elevado contenido en nitrógeno. Con respecto a componentes específicos, destacan proteínas y aminoácidos que se pueden aplicar en piensos de ganado o para pegamentos, emulsionantes y dispersantes. Otros componentes de interés son: azúcares, hormonas, compuestos aromáticos y enzimas (proteasas, catalasas, celulasas y lipasas) útiles en la industria de los detergentes (Elissen et al., 2010).

I.5.2. Producción de materia grasa

La materia grasa animal y vegetal se utiliza principalmente en el sector alimentario (más del 80% de la producción mundial) (Elissen et al., 2010); de hecho, solo el 10% de la materia grasa es convertida en productos técnicos (Behr et al., 2008).

En la actualidad, para la producción de bioproductos de interés socio-económico derivados de materia grasa se producen en mayor medida a partir de grasas vegetales como la soja, el girasol y la palma.

Los ácidos grasos se utilizan principalmente en la industria de los lubricantes y la cosmética (jabones y otros surfactantes). También se aplican como productos de limpieza, suavizantes y plásticos (Elissen et al., 2010).

I.5.2.1. Biodiésel

Durante décadas, la producción energética del ser humano se ha basado únicamente en el uso de combustibles fósiles, los cuales son una fuente finita de carbono. De hecho, el agotamiento de las reservas mundiales está relativamente próximo; lo cual se refleja en el incremento del precio del crudo (OPEC, 2017). Además, el petróleo acumula carbono que se fijó del CO₂ de la atmósfera durante milenios por lo que su combustión genera un desbalance de este gas causando problemas ambientales como el efecto invernadero o el calentamiento global (informe INEGI 1990-2010); también produce efectos perjudiciales sobre la salud pública, principalmente por el monóxido de carbono que genera su combustión (Téllez et. al., 2006). Por tanto, son imprescindibles que soluciones alternativas se abran paso en un mercado que necesita ser cubierto y, al mismo tiempo, evolucionar hacia la sostenibilidad. Una de estas alternativas es la utilización de biodiésel.

La producción de biodiésel a partir de materia grasa consiste en la transesterificación de ácidos grasos utilizando un alcohol, principalmente metanol sintetizado a bajo coste a partir de CO₂. Los triglicéridos son transesterificados generando ésteres metílicos o etílicos (biodiésel) y glicerina que es un subproducto reutilizable (Figura I.12).

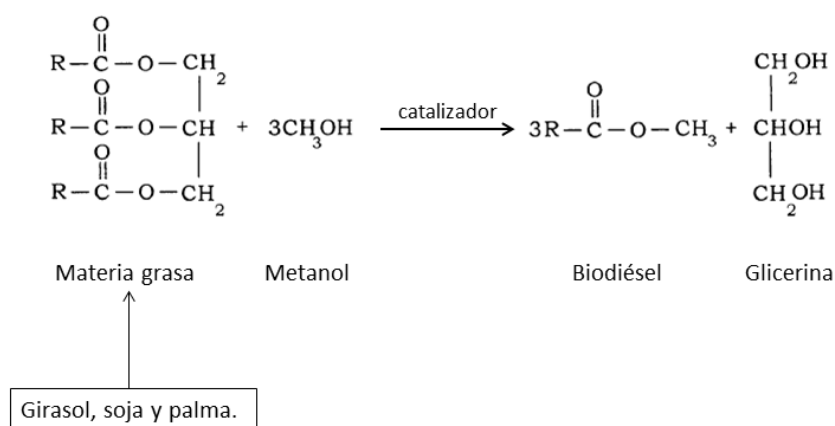


Figura I. 12. Reacción de transesterificación de materia grasa y producción de biodiésel.

Hay que señalar que la producción de biodiésel en sí misma no constituye una dificultad tecnológica puesto que ya existen procesos optimizados al respecto (Schuchardt et al., 1998). La dificultad actual para la producción de biodiésel es la fuente de obtención de la materia grasa como factor crítico a nivel económico y ambiental. Actualmente, se producen biocombustibles a partir de materias grasas vegetales; lo cual ha suscitado dos problemáticas principales: por un lado, la competencia con la industria alimentaria (como es el caso del aceite de soja, de girasol

y de palma) que produce un aumento del precio para consumo humano y la competencia por tierras cultivadas y roturación de nuevos terrenos para dedicarlos a cultivo; lo cual genera un enorme impacto ambiental. Aunque se han utilizado materias grasas a partir de vegetales no aptos para consumo humano se sigue sin solventar el segundo problema.

Con respecto a las ventajas que proporciona el biodiésel, destacan entre otras, la disminución de la emisión de compuestos aromáticos y monóxido de carbono (CO) tras la combustión y una mayor lubricación de los motores alargando la vida útil de éstos (Hajjari et al., 2017, Knothe y Razon, 2017).

Por otra parte, hay que señalar que en el futuro la gran alternativa a los combustibles fósiles, en cuanto a sostenibilidad, deben ser las energías renovables: solar, eólica, hidráulica, biocombustible, etc.

I.6. Cinética

I.6.1. Cinética y orden de las reacciones químicas

De forma general, la expresión de la velocidad de reacción (v) se puede expresar como:

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^n \quad (\text{Ec. I.5})$$

donde:

n = orden de reacción

$[A]$ = concentración de sustrato

K = constante de reacción

Integrando la ecuación I.5 desde $t = 0$ hasta $t = t$, donde la concentración del reactivo A varía entre $[A]_{t=0} = [A]_0$ y $[A]_t = [A]$ se obtienen las expresiones recogidas en la tabla I.8 para cada orden de reacción.

Tabla I. 8. Formas integradas de las leyes de la velocidad.

Orden de reacción	Ley de velocidad	Forma integrada	Ecuación
0	$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^0 = k$	$[A]_t = [A]_0 - k \cdot t$	(Ec. I.6)
1	$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]$	$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -k \cdot t$	(Ec. I.7)
2	$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2$	$\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + k \cdot t$	(Ec. I.8)
3	$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^3$	$\frac{1}{[A]_t^2} = \frac{1}{[A]_0^2} + 2 \cdot k \cdot t$	(Ec. I.9)
$n > 1$	$v = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^n$	$\frac{1}{[A]_t^{n-1}} = \frac{1}{[A]_0^{n-1}} + (n-1) \cdot k \cdot t$	(Ec. I.10)

$[A]$ = concentración de reactivo a tiempo t

$[A]_0$ = concentración inicial de reactivo

n = orden de reacción

K = constante de reacción

Con estas ecuaciones, se puede determinar la constante de reacción en función de la representación gráfica de la variación de la concentración de sustrato respecto al tiempo. Tras un ajuste lineal por mínimos cuadrados con una correlación aceptable ($R^2 > 0,75$), se puede determinar el orden y la constante de reacción.

I.6.2. Cinética del crecimiento

I.6.2.1. Velocidad específica máxima de crecimiento

Al no existir bibliografía respecto a la cinética de *C. elegans*, la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento se ha realizado de forma similar a la aplicada a los cultivos microbianos. Un cultivo de nematodos en crecimiento equilibrado imita una reacción autocatalítica de primer orden; es decir, el aumento del número de nematodos totales en un tiempo dado es proporcional al número de nematodos formados en ese tiempo (Ec. I.11).

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (\text{Ec. I.11})$$

Sin embargo, esta expresión sólo es correcta si el tamaño del nematodo permaneciera constante. Por ello, es más apropiado indicar:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{Ec. I.12})$$

Donde el factor de proporcionalidad, μ , es un índice de la velocidad de crecimiento por unidad de concentración de biomasa y se denomina velocidad específica de crecimiento (Ec. I.12).

En la fase de crecimiento exponencial $\mu = \mu_m = \text{constante}$,

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (\text{Ec. I.13})$$

por lo que integrando la expresión ec. I.13 se puede deducir:

$$X = X_i \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_i)} \quad (\text{Ec. I.14})$$

Donde:

X_i = Concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial.

t_i = Tiempo al que comienza la fase exponencial.

μ_m = Velocidad específica máxima de crecimiento.

Esta ecuación puede también escribirse como:

$$\ln\left(\frac{X}{X_i}\right) = \mu_m \cdot (t - t_i) \quad (\text{Ec. I.15})$$

Y dado que $X_i \approx X_0$,

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = a + \mu_m \cdot t \quad (\text{Ec. I.16})$$

Donde X_0 es la concentración inicial de biomasa a $t = t_i$ y “a” una ordenada no nula.

Ajustando, los resultados experimentales biomasa-tiempo en la forma indicada por la ecuación I.16, mediante mínimos cuadrados, puede determinarse la velocidad específica máxima de crecimiento.

I.6.2.2. Productividad de la biomasa de nematodos

Se observa en muchos cultivos que durante la fase de desaceleración, la concentración de biomasa aumenta linealmente en el tiempo. Este hecho es compatible con la expresión (Ec. I.17) y con que la velocidad de crecimiento permanezca constante:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X = \text{constante} = P_1 \quad (\text{Ec. I.17})$$

Por integración se obtiene que:

$$(X_f - X_{II}) = P_1 \cdot (t_f - t_{II}) \quad (\text{Ec. I.18})$$

Donde:

X_{II} y X_f = Concentración de biomasa al inicio y final de la fase lineal.

t_{II} y t_f = Tiempos de inicio y final de la fase lineal.

P_1 = Velocidad de crecimiento global durante esta fase de crecimiento lineal.

En la fase de desaceleración del crecimiento, la velocidad específica de crecimiento disminuye de forma continua durante un período de tiempo más o menos prolongado. En ocasiones, como ya se ha indicado, en parte de este período puede admitirse un crecimiento lineal:

$$X_1 = c + P \cdot t_1 \quad (\text{Ec. I.19})$$

donde P representa la productividad en biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) durante este período de tiempo, y “c” la ordenada en el origen en el ajuste de X frente a t.

I.6.2.3. Velocidad específica máxima de muerte

Después de la fase estacionaria o desaceleración, en el caso de que no aparezca la fase estacionaria, se observa la fase de muerte de los nematodos. La determinación de la velocidad específica máxima de muerte, μ_d , puede realizarse de forma similar a la utilizada en la determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento.

I.6.3. Modelos cinéticos

I.6.3.1. Modelo cinético de Monod

Los procesos biológicos de reducción de fango, no se ajustan a los simuladores y modelos actualmente aceptados como son: “International Water Association’s ASM Model” y “Anaerobic Digestion Model” (ADM). Moussa et al., (2005) desarrollaron un modelo semejante a ASM de Henze (Henze et al., 2000), describe las interacciones entre nitrificantes, heterótrofos y depredadores en aguas residuales (Moussa et al., 2005). El modelo incluye seis compuestos solubles (oxígeno disuelto, N₂ gas, amonio, nitritos, nitratos y DQO) y 5 tipos de biomasa (oxidadores de amonio, oxidadores de nitrito, heterótrofos, depredadores y biomasa inerte). Las expresiones cinéticas se basan en las ecuaciones de Monod (Monod, 1949). En este modelo se consideran 2 velocidades de degradación: aerobia en presencia de O₂ y anaerobia en ausencia de O₂ y presencia de NO₃⁻ (Khursheed y Kazmi, 2011).

Crecimiento con limitación de sustrato. En cultivos discontinuos, si uno de los requisitos esenciales para el crecimiento, como puede ser el sustrato o algún nutriente, se encuentra en bajas concentraciones que puedan llegar a ser limitantes, se agotará en primer lugar deteniendo el crecimiento (Lee et al., 2015). Se ha determinado empíricamente que en presencia de un factor limitante, se puede utilizar como modelo cinético la ecuación desarrollada por Monod (Monod, 1949):

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Ec. I.20})$$

donde:

μ = velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹)

S = concentración de sustrato que limita el crecimiento (g/L)

K_s = constante de saturación del nutriente limitante (g/L)

Es importante tener en cuenta que mientras la expresión utilizada describa el fenómeno observado, no importa que no tenga relación alguna con las expresiones que aparecen con más frecuencia en la literatura (Metcalf y Eddy, 2000).

I.6.3.2. Inhibición por sustrato o producto (Modelo de Tessier)

Se considera que la ecuación de Monod (1949), representa la variación de la velocidad de crecimiento respecto a la concentración de sustrato en ausencia de inhibidores. Sin embargo, en algunos casos la aplicación de este modelo a la realidad no siempre se cumple por lo que Moser (1958) incluyó un parámetro empírico extra y Tessier (Tessier, 1942) propuso la hipótesis de deficiencia del crecimiento que generaba una expresión semi-logarítmica entre velocidad del crecimiento y concentración de sustrato.

$$\mu_m = \mu \cdot \left(e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s} \right) \quad (\text{Ec. I.21})$$

donde:

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})

S = concentración de sustrato que limita el crecimiento (g/L)

K_s = constante de saturación (g/L)

K_i = constante de inhibición, concentración de sustrato (g/L)

CAPÍTULO II.OBJETIVOS

Las estaciones de depuración de aguas residuales urbanas (EDARs) generan grandes cantidades de fango, como resultado de la separación de la materia sólida del agua. Este fango generado necesita ser estabilizado para evitar su posible riesgo a la salud humana. Actualmente, la mayoría de las EDARs optan por la concentración de este fango en espesadores para luego ser digerido en un biorreactor anaerobio, donde se genera el biogás (gas metano + CO₂).

Desde el punto de vista operativo, las EDARs se enfrentan a grandes problemas a la hora de gestionar y evacuar el fango. La poca digestibilidad del fango y la mala calidad del biogás generado, lo que implica que grandes volúmenes de fango se quedan sin poder ser gestionados de forma adecuada, lo que genera un problema ambiental real para las EDARs.

Considerando que la composición principal del fango es una biomasa bacteriana. En este trabajo de investigación, se ha evaluado, como objetivo principal, la capacidad del nematodo *C. elegans*, como un depredador de bacterias, para alimentarse a base de fango de depuradoras para reducir la cantidad de residuo y evaluar la viabilidad de la producción de materia grasa del nematodo para biodiésel. Los objetivos específicos son:

- Evaluar la posibilidad de utilizar el fango como sustrato para el cultivo de *C. elegans* estudiando el crecimiento del nematodo.
- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento del nematodo, tales como, la velocidad específica máxima de crecimiento, productividad en biomasa, velocidad específica máxima de muerte y los rendimientos de producción en biorreactores.
- Establecer la cinética de degradación del fango en tres niveles: i) efluente global, ii) fase líquida (agua tratada) y iii) biomasa global (fango + nematodo).
- Evaluar la composición bioquímica de la biomasa global (fango + nematodo) durante y al final del cultivo.
- Concretar las propuestas de los posibles aprovechamientos de la biomasa final obtenida. Por ejemplo, materia grasa para la producción de biodiésel.
- Determinar los porcentajes de degradación del fango como resultado del cultivo de nematodo.
- Evaluar la composición final del agua tratada como resultado del cultivo de nematodo.
- Desarrollar un estudio económico para verificar la viabilidad del nuevo proceso propuesto.

El desarrollo de esta investigación, ha comenzado con la caracterización físico-química de los fangos generados en diferentes puntos de la depuradora. También, se ha hecho un seguimiento de la composición físico-química del fango a lo largo del año. Paralelamente, se han llevado a cabo cultivos del nematodo *C. elegans* en placas de agar (medio sólido) y en matraces (medio líquido); con el objetivo de observar el crecimiento y la población de nematodos obtenida en función del fango utilizado como medio de cultivo.

Posteriormente, se ha cultivado *C. elegans* en biorreactores con el objetivo de determinar su cinética de crecimiento. También se ha estudiado, a lo largo y al final de los cultivos: la degradación en la biomasa global (fango + nematodos), la variación en la calidad de la fase líquida (agua tratada), la degradación en el efluente global y las reducciones alcanzadas en fango tras los cultivos mixtos con el nematodo. La experimentación realizada se ha basado en el desarrollo de diferentes series donde se ha modificado uno de los parámetros de operación:

1. Influencia de la concentración inicial de fango
2. Efecto de la velocidad de agitación mecánica
3. Influencia de la velocidad de suministro de aire

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material biológico

III.1.1. Estirpes de *C. elegans* y *E. coli*

Las cepas de *Caenorhabditis elegans* y *Escherichia coli* requeridas para este trabajo han sido obtenidas del “Caenorhabditis Genetics Center” (CGC).

La bacteria *E. coli* constituye el alimento para *C. elegans* en los medios de cultivo estándar de laboratorio. Se ha trabajado con dos cepas bacterianas:

- *E. coli* OP50 se utiliza para el cultivo de nematodos en placas de agar de NGM (“Nematode Growth Medium”) protocolo detallado por Brenner (Brenner, 1974; Byerly, et al., 1976).
- *E. coli* X1666 es utilizada para cultivo de nematodos en suspensión como fuente de carbono en “S-Medium” (Lewis y Fleming, 1995).

No hay diferencias nutricionales para el nematodo entre el uso de una u otra estirpe de *E. coli*.

Por su parte, las cepas de *C. elegans* utilizadas están recogidas en la tabla III.1.

Tabla III. 1. Estirpes de *C. elegans* utilizadas.

Cepa de <i>C. elegans</i>	Genotipo	Fenotipo
N2	<i>N2 (ancestral)</i>	silvestre
GM331	<i>daf-2 (e1370) III</i>	mutante obeso
RE666	<i>ire-1 (v33) II</i>	mutante obeso
CB169	<i>unc-31 (e169) IV</i>	mutante de movilidad
MT9668	<i>mod-1 (ok103)V</i>	mutante de movilidad

III.1.2. Fango

Las muestras de fango han sido recogidas periódicamente de la EDAR de referencia Copero localizada en la provincia de Sevilla (España); coordenadas 37°18'21"N 5°59'14"O. El muestreo se realiza en garrafas de plástico de entre 1 y 5 litros de volumen.

Para minimizar los cambios que pueda sufrir el fango, es almacenado en una cámara fría a 4°C.

En los submuestreos, se agita fuertemente la garrafa y se adiciona el fango en un bote de vidrio de 500 ml; después, se mantienen a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos antes de realizar cualquier experimento.

Se ha recogido y ensayado con muestras de fangos generados en distintos puntos del proceso de depuración:

- Fango de recirculación biológica (Rec. bio.)
- Fango del espesador primario o de gravedad (Esp. 1º)
- Fango del espesador secundario o de flotación (Esp. 2º)
- Fango de la cámara de mezcla (C.M.)
- Fango del digestor (Dig.)

III.2. Cultivo de *C. elegans*

Los cultivos del nematodo se han realizado en medio sólido (placas de agar) y medio líquido (matraces en orbital rotatorio). A su vez, se distinguen los cultivos estándares para el mantenimiento del nematodo a partir de *E. coli* y, por otra parte, las adaptaciones de las condiciones de cultivo utilizando fango como fuente de carbono.

III.2.1. Cultivo estándar y mantenimiento en *E. coli*

III.2.1.1. Placas de agar con NGM

Para el mantenimiento y crecimiento de *C. elegans* en laboratorio, se utilizan placas de agar con un medio de cultivo denominado NGM ("Nematode Growth Medium") protocolo de Brenner, 1974.

En la preparación de NGM se mezclan:

- NaCl	3 g
- Peptona (Difco)	2,5 g
- Agar	20 g
- H ₂ O destilada (Enrasar)	1 L

Se autoclava la preparación y se deja enfriar sin que solidifique. Seguidamente se adicionan los compuestos que se indican en la tabla III.2.

Tabla III. 2. Compuestos adicionados al litro de stock preparado con NaCl, peptona, agar y agua destilada.

Compuesto	Volumen adicionado	Stock
1° NaCl	1 ml	1 M
2° MgSO ₄	1 ml	1 M
3° KH ₂ PO ₄	25 ml	1 M pH 6
4° Colesterol*	1 ml	1,29·10 ⁻² M

*Todos los stocks están disueltos en agua destilada y autoclavados; excepto el colesterol que está diluido en etanol PA al 95% (v/v) y se esteriliza utilizando un filtro de poro 0,2 µm debido a que es termolábil.

El medio NGM preparado se extiende en placas de 60 mm de diámetro con una bomba peristáltica con la siguiente configuración: 19 ml de volumen, 0,3-1 segundo de tiempo y 120 rpm. Finalmente, se deja solidificar a temperatura ambiente y se añaden 100 µl de *E. coli* OP50 utilizando una pipeta eléctrica de punta redondeada para

extender la bacteria en la superficie de la placa. Se incuban a 37°C durante una noche generándose un césped bacteriano y se almacenan a 4°C hasta su utilización.

Una de las ventajas de *C. elegans* es su sencillo y económico mantenimiento. Cuando una placa está saturada se realizan varios cortes en el agar con un bisturí estéril, se traspasan los cortes de agar a las nuevas placas y se incuban en estufas entre 16 y 25°C.

Cultivo de *E. coli*

La bacteria *E. coli* se crece previamente en medio rico de LB (“Lysogenic Broth”) (Bertani, 1951), a 37°C y 180 rpm durante una noche, alcanzándose una concentración aproximada de 10⁹ unidades formadoras de colonias (u.f.c.).

Preparación de LB

- | | |
|----------------------------|---------|
| - Triptona | 10 g |
| - Extracto de levadura | 5 g |
| - NaCl | 5 g |
| - Agua destilada (Enrasar) | 1 Litro |
| - Autoclavar el medio | |

III.2.1.2. Matraces en orbital rotatorio con S-Medio

La opción de crecer *C. elegans* en medio líquido, posibilita que el sistema de cultivo pueda ser escalable en un proceso industrial. Además, permite obtener mayores cantidades de nematodos que en medio sólido; por lo tanto, se ha utilizado en este trabajo de investigación, principalmente, para la obtención de los preinóculos en los experimentos con fango.

El crecimiento del nematodo se realiza en matraces Erlenmeyer de entre 100 y 500 ml, a los cuales se adiciona una quinta parte de su volumen de medio de cultivo. Los matraces se colocan en un agitador en orbital rotatorio a una temperatura de 20°C y una agitación de 170 rpm.

El medio líquido utilizado se denomina S-Medio (Lewis y Fleming, 1995); cuya fuente de carbono es la bacteria *E. coli* X1666 en un porcentaje del 3% en peso húmedo.

PROCEDIMIENTO

Inicialmente se crece la bacteria en 5 L de LB para obtener aproximadamente 1 L de S-Medio.

Preparación de LB (Luria Bertani)

- | | |
|----------------------------|---------|
| - Triptona | 10 g |
| - Extracto de levadura | 5 g |
| - NaCl | 5 g |
| - Agua destilada (Enrasar) | 1 Litro |
| - Autoclavar el medio | |

Preinóculo de *E. coli*

- Descongelar la cepa X1666 y utilizar un asa de siembra para aislar colonias en placas de LB. Incubar a 37°C durante una noche.
- Picar una colonia aislada para cultivar el preinóculo en un matraz de 100 ml con 20 ml de LB y dejar crecer a 37°C y 170 rpm de agitación en orbital rotatorio durante una noche.

Inóculo de *E. coli*

- Repartir 5 L de LB en 4 matraces de 5 L de volumen, añadiendo en cada uno de ellos 1,25 L aproximadamente.

- Adicionar 5 ml del preinóculo de *E. coli* X1666 a cada matraz y crecer a 37°C y 170 rpm de agitación en orbital rotatorio durante una noche.

Recuperación de las bacterias

Mediante centrifugación, se recoge la biomasa de *E. coli* (precipitado) y se retira el LB (sobrenadante) como se explica a continuación:

- Utilizar 4 botes de centrifuga de 600 ml (estériles) y pesar vacíos.
- Llenar los botes con el cultivo de *E. coli* crecida en LB, pesar y compensar para la centrifugación.
- Centrifugar a 4.500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.
- Desechar el sobrenadante.
- Repetir los pasos anteriores para utilizar los 5 Litros de cultivo.
- Pesar los botes con el precipitado final y calcular la biomasa de *E. coli* obtenida (normalmente entre 25 y 35 gramos en peso húmedo).

Preparación de S-Medio

Una vez determinada la cantidad de *E. coli* recuperada. Se calcula la proporción de los siguientes componentes del S-Medio teniendo en cuenta que la concentración de *E. coli* en el medio será del 3% en peso húmedo. En función de la cantidad de bacterias obtenidas, se prepara un volumen determinado de lo que se denomina “S-Basal” como se indica en la expresión ec. III.1.

$$\frac{3 \text{ (g de bacterias)}}{x' \text{ (g de bacterias obtenidas)}} = \frac{100 \text{ (ml de S – Basal)}}{x \text{ (ml de S – Basal a preparar)}} \quad (\text{Ec. III. 1})$$

Para preparar 1 Litro de S-Basal, se añaden las siguientes soluciones estériles:

- NaCl	5M	20 ml
- KH ₂ PO ₄	1M pH6	50 ml
- Colesterol	1,29·10 ⁻² M	1 ml
- Agua Mili-Q (Enrasar)		1 Litro

A su vez, por cada 1 Litro de S-Basal a preparar, se adicionan las siguientes soluciones estériles:

- Citrato potásico 1M	10 ml
- Trazas de Metales 100x	10 ml
- CaCl_2 1M	3 ml
- MgSO_4 1M	3 ml

Finalmente, se resuspende la biomasa bacteriana de los botes de centrifuga, y se almacena en botes de vidrio estériles a 4°C.

Trazas de Metales 100x

Para la preparación del stock de trazas metálicas 100x, se adicionan los siguientes compuestos en la proporción indicada en la tabla III.3.

Tabla III. 3. Preparación de stock de trazas metálicas 100x.

Compuesto	Cantidad adicionada
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,346 g
Na_2EDTA	0,930 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,0980 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,144 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,012 g
H_2O destilada	500 ml

* Autoclavar y cubrir en papel de aluminio

III.2.1.3. Separación por gradiente de sacarosa

El gradiente de densidades, permite separar el nematodo de la *E. coli* presente en el S-Medio y así incrementar la limpieza de la muestra. Entre otras finalidades, este método de separación se ha utilizado para la preparación de preinóculos en los experimentos con fango.

Primeramente, se adiciona el cultivo de nematodos en varios tubos de 15 ml, se centrifuga 1 minuto a 1.000 rpm y se elimina el sobrenadante mediante vacío. Seguidamente se añade agua mili-Q fría (4°C) hasta 7 ml y se agita el tubo. A continuación se adiciona sacarosa fría (4°C) al 60% p:p hasta enrasar en 14 ml, se agita el tubo y centrifuga 2 minutos a 500 rpm. En la parte superior del tubo queda una capa limpia de nematodos y en el precipitado los restos del medio de cultivo. Con una pipeta Pasteur de vidrio, se pasa la capa de nematodos a otro tubo que se llena de agua a temperatura ambiente hasta 14 ml. Se centrifuga 1 minuto a 2.000 rpm y se elimina el sobrenadante mediante vacío. Este último paso se repite tres veces para lavar totalmente la muestra. Finalmente, se agrupan los precipitados de todos los tubos y se realizan tres conteos en la lupa para determinar el número de nematodos.

III.2.1.4. Solución M9

En la experimentación con *C. elegans*, en ocasiones es necesario realizar lavados o recoger los nematodos de placas para trasladarlos al medio líquido. Para ello puede utilizarse una solución tamponada denominada M9 constituida por:

- KH ₂ PO ₄	3 g
- Na ₂ HPO ₄	6 g
- NaCl	5 g
- MgSO ₄ (1M)	1 ml
- H ₂ O mili-Q	Enrasar hasta 1 L y autoclavar

Esta solución reduce el estrés osmótico que puede sufrir el nematodo en agua por lo que es más recomendable su utilización. Sin embargo, para preinóculos de fango, el último lavado siempre se realiza en agua para eliminar las sales antes de inocular.

III.2.2. Cultivo en fango

III.2.2.1. Preinóculos

El nematodo *C. elegans* se ha mantenido continuamente creciendo en placas de agar en medio NGM con *E. coli* OP50 a 20°C. Por tanto, para obtener un número determinado de nematodos que se utiliza como inóculo en experimentos con fango, se añaden 3 ml de agua mili-Q a varias placas, se agitan y se recogen mediante pipeteo para adicionarlos a un matraz Erlenmeyer de 250 ml de volumen total y que contiene 50 ml de S-Medio (*E. coli* X166). El matraz se tapa con un algodón para mantener las condiciones de esterilidad permitiendo el intercambio de gases y se coloca en un agitador de orbital rotatorio a 20°C y 170 rpm (Lewis y Fleming, 1995). En los experimentos en biorreactores, se utilizarán tres matraces de 250 ml para la obtención de una mayor cantidad de nematodos como preinóculo.

Se realiza un seguimiento diario a través de observación en lupa y mediante conteo se extrapola y determina el número de nematodos totales. Es importante tener en cuenta, que los inóculos no pueden provenir de cultivos saturados; por tanto, en el cultivo de origen no se deben superar los 30.000 nematodos/ml, debe haber presencia de madres con huevos y diferentes estadios larvarios. Además, no pueden estar presentes otros indicativos de saturación como son los “dauers” (larva de resistencia que se induce por condiciones de estrés) y los “internal hatching” (madres cuyos huevos eclosionan en su interior).

Para separar los nematodos del resto del medio (*E. coli*) se realiza un gradiente de densidades (“gradiente de sacarosa”) y así inocular solamente nematodos en el fango.

Tras el gradiente, se tiene una muestra de nematodos limpios, se realizan tres conteos en lupa y se calcula el volumen de inóculo. Con el objetivo de minimizar la posible influencia del volumen de inoculación, se ajusta en 0,5 ml para matraces Erlenmeyer y 20 ml para biorreactores.

III.2.2.2. Medio sólido en placas de agar

Para realizar el cultivo del nematodo en medio sólido a partir de fango, se utilizan placas de cultivo de 8 cm de diámetro de medio NGM de agar sin *E. coli* y sin peptonas (para condicionar que la única fuente de carbono es el propio fango).

Primeramente, se adicionan 250 µl de fango en el centro de la placa, se extiende el fango con una pipeta serológica de 5ml, en posición oblicua y se deja secar destapada durante 10 minutos. Si el experimento requiere una concentración de fango diferente al 100%, se realizan las diluciones v/v previamente en tubos “eppendorf”.

A continuación, se añaden 20 nematodos en fase larvaria L4 cogidos individualmente con un hilo de platino de una placa donde habían estado creciendo a partir de *E. coli* OP50. Se mantiene en estufa a una temperatura controlada de 20°C. Diariamente se determina el estado de la población mediante la observación en lupa y cuando la población está saturada (dejan de observarse huevos, aparecen dauers y/o “internal hatching”), se realiza el conteo final de nematodos lo cual ocurre aproximadamente tras 5 o 6 días para el nematodo silvestre N2.

Para recoger los nematodos de la placa, se adicionan 5 ml de solución M9 (también se puede hacer con H₂O), se agita con la mano, se raspa suavemente con una pipeta en oblicuo y se recogen los 5 ml con la misma pipeta para echarlos en un tubo de 15ml. Se repite el paso anterior y se enrasa el tubo con agua.

CONTEO

Para realizar el conteo, se agita el tubo y se pipetea una muestra de entre 2,5 y 100 µl (dependiendo de la concentración de nematodos). Se extiende la gota en un porta-objetos y se cuenta en la lupa, teniendo validez con más 20 nematodos/gota, aunque idealmente se deben contar más de 80 nematodos/gota para minimizar errores en la extrapolación. Repetir el conteo 3 veces (repetir si se observan valores extremos).

Finalmente se calcula la media y el número de nematodos totales. A partir del cual se determina el número de nematodos por placa (Ec. III.2). Se utilizan 2 o 3 réplicas para cada condición experimentada.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de nematodos}}{\text{placa}} = \frac{\text{Promedio del } n^{\circ} \text{ de nematodos contados}}{\text{placa}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{contado}}} \quad (\text{Ec. III. 2})$$

donde:

V_{contado} = volumen de gota extendida en el porta-objetos

V_{total} = volumen de enrasado del tubo (15 ml)

Todos los ensayos se han realizado con un mínimo de dos réplicas (N=2) y la desviación estándar (\pm DS) representa la desviación respecto al valor medio de ambas. A su vez, cada conteo de la población de nematodos se ha realizado por triplicado.

III.2.2.3. Medio líquido

A) Matraces en orbital rotatorio

El cultivo líquido de *C. elegans* a partir de fango, se realiza en matraces Erlenmeyer en orbital rotatorio.

Se añaden 20 ml de fango en matraces de 100 ml constituyendo fango al 100% de concentración. Para experimentos que necesiten otras concentraciones de sustrato, las diluciones están constituidas por fango y agua mili-Q, realizándose mediante pesada en balanza y expresándose en % de v/v puesto que la densidad es prácticamente 1 g/ml para ambos.

También se adicionan los siete componentes propios del S-Medio en la misma proporción con la excepción de la *E. coli* que es sustituida por el fango como fuente de carbono. Las cantidades están recogidas en la tabla III.4:

Tabla III. 4. Componentes adicionados al medio de cultivo a partir de fango.

Compuesto	[Compuesto en stock]	Cantidad adicionada (μl)
NaCl	5 M	400
KH ₂ PO ₄	1 M	1.000
Colesterol (C ₂₇ H ₄₆ O)	1,29·10 ⁻² M	20
Citrato potásico (C ₆ H ₅ K ₃ O ₇)	1 M	200
Trazas de metales	100x	200
CaCl ₂	1 M	60
MgSO ₄	1 M	60

Las proporciones volumétricas totales se recogen en la siguiente expresión:

$$V_{total} = V_{fango} (20 \text{ ml}) + V_{7-componentes} (1,98 \text{ ml}) + V_{inóculo} (\sim 0,5 \text{ ml}) \quad (\text{Ec. III. 3})$$

Se crece el preinóculo y se realiza la inoculación de un determinado número de nematodos que generalmente es de 100 o 500 nematodos/ml, según se especifique en cada experimento. Seguidamente se coloca en un agitador orbital rotatorio a una velocidad de agitación de 170 rpm y una temperatura de 20°C.

Se realiza conteo y anotación diaria de los nematodos/ml vivos: L1, L2, L3, L4, adultos y dauer.

El máximo poblacional se corresponde con la predominancia de L1, presencia de daueres y algún “internal hatching”.

CONTEO

Se agita el matraz y se pipetea directamente un volumen de muestra conocido entre 2,5 y 100 μ l (dependiendo de la densidad de la población de nematodos); se extiende la gota en un porta-objetos. El conteo se considera: válido para más de 20 nematodos/gota; idealmente se debe contar un número mayor a 80 nematodos/gota para minimizar errores de conteo. Repetir el conteo 3 veces (repetir si se observan valores extremos).

Finalmente, calcular media y número de nematodos totales. A partir del cual se puede determinar también el número de nematodos por ml de fango. Se utilizan 2 o 3 réplicas para cada condición experimentada.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de nem.}}{ml} = \frac{\text{Promedio del } n^{\circ} \text{ de nem. contados}}{V_{\text{muestra contada}}} \quad (\text{Ec. III.4})$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ de nem.}}{ml \text{ de fango}} = \frac{\text{Promedio del } n^{\circ} \text{ de nem. contados}}{V_{\text{muestra contada}}} \times \frac{V_{\text{total del matraz}}}{V_{\text{fango}}} \quad (\text{Ec. III. 5})$$

La ecuación III.4 hace referencia a la densidad poblacional en el cultivo. Por otra parte, la ecuación III.5 incluye el factor de dilución del fango (v/v) por lo que se obtiene un valor de crecimiento poblacional respecto a una determinada cantidad de fango inicial.

Los ensayos llevados a cabo en matraces se han realizado con un mínimo de dos réplicas (N=2) y la desviación estándar (\pm DS) representa la desviación respecto al valor medio de ambas. A su vez, cada conteo de la población de nematodos se ha realizado por triplicado.

B) Biorreactores

B.1) Instalación

La experimentación en biorreactores de tanque agitado de 1 L de volumen se ha realizado en la instalación que se muestra en la figura III.1. Los equipos de trabajo permiten controlar y modificar los siguientes parámetros de operación: concentración de sustrato, temperatura, caudal de aireación, velocidad y tipo de agitación mecánica.

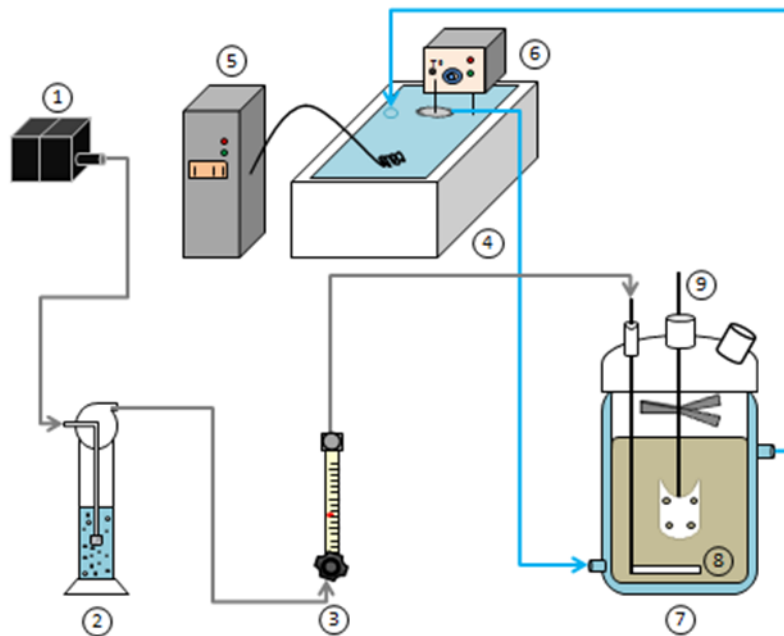


Figura III. 1. Elementos del sistema de cultivo de *C. elegans* a partir de fango en biorreactores: bomba de aire (1), frasco lavador (2), rotámetros (3), baño de agua (4), condensador de dedo frío (5), cabeza calefactora con termostato (6), reactor de 1 L de volumen (7), difusor con placa porosa (8) y varilla agitadora (9).

Parámetros de operación controlados:

- Temperatura constante de 20°C. Se utiliza un baño de agua que se enfría por un condensador de dedo frío; a su vez, la temperatura es controlada por una cabeza calefactora con termostato y el agua se bombea a través de la camisa de los biorreactores.
- Concentración de fango inicial. Se obtiene diluyendo en agua mili-Q en % v/v.
- Aireación. El aire es bombeado a través de un frasco lavador que humedece y refrigera el aire de entrada (20°C). El control del caudal de aire se realiza

mediante el paso por rotámetros. Finalmente llega a un difusor con placa porosa (poro 2) situado en la base del reactor que oxigena el medio.

- Agitación mecánica. En este trabajo se ha controlado la velocidad de agitación para los siguientes tipos de agitación:

- Agitador magnético con barra imantada (4 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro).

- Rotor con agitador de aspas de: Hélice, Rushton o tipo “U”.

- Antiespumantes. Para controlar la espuma que se genera y mantener la homogeneidad en el biorreactor, se han aplicado los antiespumantes:

- Químicos: A concentrado (Sigma Aldrich), 204 (Sigma Aldrich), AFC 5610 (HANSA -CHT R. Beitlich-) y Evescol (Igcar). Se adicionan unas gotas diarias por la pared del biorreactor en función de la cantidad de espuma que se genere (0-3 gotas en cada medición -tres mediciones por día-).

- Mecánico: aspas superficiales de PVC, situadas por encima del nivel de fango que eliminan la espuma mediante su rotura física.

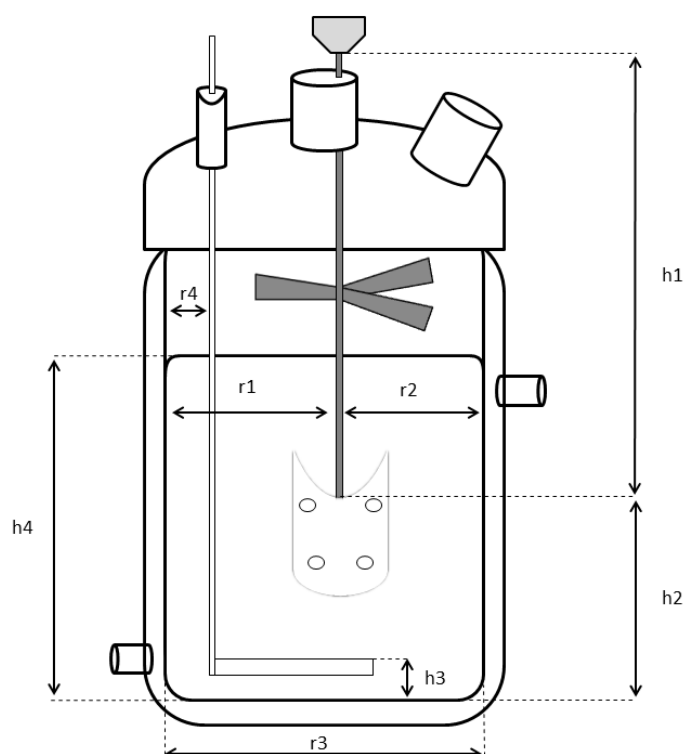


Figura III. 2. Detalle de biorreactor de vidrio con agitación mecánica con aspas de tipo “U” excéntrica, difusor de aire con placa porosa y aspas superficiales de PVC para la eliminación de espuma. Dimensiones: $h_1= 28$ cm; $h_2= 7$ cm; $h_3= 3$ cm; $h_4= 14,2$ cm; $r_1= 5,3$ cm; $r_2= 3,8$ cm; $r_3= 10$ cm y $r_4= 0,8$ cm.

En la figura III.2 se puede observar el diseño sobre plano para un biorreactor con agitación mecánica; concretamente utilizando aspas de tipo “U” como método de agitación mecánica y aspas de PVC superficiales como método antiespumante. En la figura III.3 se recogen imágenes reales de la instalación.



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura III. 3. Imágenes de la instalación utilizada. Biorreactor preparado para cultivo con agitación mediante rotor con aspas de Hélice (A). Detalle del difusor de aire de placa porosa - poro2- (B). Biorreactor en funcionamiento con fango como medio de cultivo (C). Instalación de varios biorreactores con fango como medio de cultivo (D).

B.2) Cultivo

El cultivo de *C. elegans* a partir de fango en biorreactores de 1 L de volumen constituye uno de los principales objetivos de este trabajo. Para ello se realiza el cultivo del nematodo como se describe a continuación.

Se añaden 1.000 ml de fango en los biorreactores si el experimento es con fango al 100% v/v. Para que el medio esté a una concentración diferente, se diluye el fango en agua mili-Q en proporción v/v utilizando una probeta (el resto del protocolo se mantiene exactamente igual).

De manera equivalente al cultivo en matraces, se añaden los siete componentes de manera proporcional al volumen de trabajo como se indica en la tabla III.5.

Tabla III. 5. Componentes adicionados al medio de cultivo a partir de fango.

Compuesto	[Compuesto en stock]	Cantidad adicionada (ml)
NaCl	5 M	20
KH ₂ PO ₄	1 M	50
colesterol (C ₂₇ H ₄₆ O)	1,29·10 ⁻² M	1
Citrato potásico (C ₆ H ₅ K ₃ O ₇)	1 M	10
Trazas de metales	100x	10
CaCl ₂	1 M	3
MgSO ₄	1 M	3

Seguidamente se lleva a cabo la inoculación que durante este trabajo ha sido de 100 o 500 nematodos/ml, especificándose en cada experimento y quedando un volumen total recogido en la ecuación III.6. Ver preparación de preinóculos y gradiente de sacarosa.

$$V_{total} = V_{fango} (1.000 \text{ ml}) + V_{7-componentes} (97 \text{ ml}) + V_{inóculo} (\sim 20 \text{ ml}) \quad (\text{Ec. III. 6})$$

Se realiza el conteo tres veces al día de los nematodos/ml vivos: L1, L2, L3, L4, adultos y dauer.

Cuando la población alcanza el máximo crecimiento, se observan indicios de saturación como: dauers, predominancia de L1 y algún “internal hatching”.

MUESTREOS

Para obtener muestras del biorreactor, se detiene la agitación mecánica y se disminuye la aireación a 0,5 L/min durante unos 10 segundos previos a la toma de muestra. Las muestras se extraen desde la zona central del biorreactor para las medidas de: pH, conductividad, conteo de la población, mediciones para el TOC, DQO (efluente global y sobrenadante), Sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos no volátiles (SNV).

Las muestras para la medición del pH, conductividad y conteo de la población se obtienen tres veces al día introduciendo una pipeta de 5 ml; se pipetea 3 muestras independientes de 3 ml cada una en tubos de 10 ml. Una muestra se utilizará para la medida de pH y conductividad eléctrica y las otras dos muestras se emplean para el conteo de la población de nematodos.

Las muestras para la determinación de ST, SV y SNV y la DQO se realizan solamente a tiempo 0 y tiempo final. Se introduce una pipeta de 25 ml para pipetear 10 ml para ST, SV y SNV, 10 ml para la medida de DQO del efluente global y 20 ml que se centrifugarán para la medida de DQO de la fase acuosa. Las muestras son congeladas a una temperatura de -20°C hasta su medición.

Por otra parte, diariamente se extraen dos muestras para las mediciones del aparato TOC, una de ellas de 10 ml para el efluente global y otra muestra de 20 ml que será posteriormente centrifugada para la determinación de la fase acuosa. Las muestras son congeladas a -20°C hasta su medición al final del experimento.

CONTEO

Partiendo de los tubos con 3 ml de muestra, se pipetea un volumen conocido de 2,5 – 100 µl (dependiendo de la concentración de nematodos) y se extiende la gota en un porta-objetos. El conteo se considera: válido para más de 20 nematodos/gota; aunque idealmente se debe contar un número mayor a 80 nematodos/gota para minimizar errores de conteo. Repetir el conteo 3 veces para cada tubo (repetir si se observan valores extremos).

Finalmente, calcular media y número de nematodos totales. A partir del cual se determina el número de nematodos/ml de fango.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de nem.}}{ml} = \frac{\text{Promedio del } n^{\circ} \text{ de nem. contados en los dos tubos}}{V_{\text{muestra contada}}} \quad (\text{Ec. III. 7})$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ de nem.}}{ml \text{ de fango}} = \frac{\text{Promedio del } n^{\circ} \text{ de nem. contados}}{V_{\text{muestra contada}}} \times \frac{V_{\text{total del biorreactor}}}{V_{\text{fango}}} \quad (\text{Ec. III. 8})$$

La ecuación III.7 hace referencia a la densidad poblacional en el biorreactor; mientras que la fórmula III.8 incluye el factor de dilución del fango (% v/v) obteniéndose un valor de crecimiento poblacional respecto a una determinada cantidad de fango inicial.

III.3. Caracterización del fango y seguimiento de los cultivos

III.3.1. Sólidos totales, materia orgánica, cenizas y humedad

El fango es un sistema semisólido constituido por agua, mayoritariamente, y materia sólida. Los sólidos totales (ST) se subdividen, a su vez, en sólidos volátiles (SV), es decir, materia orgánica y sólidos no volátiles (SNV) denominados materia inorgánica o cenizas.

$$Fango = H_2O + ST \quad (\text{Ec. III. 9})$$

$$ST = SV + SNV \quad (\text{Ec. III. 10})$$

Se utilizó un método termo-gravimétrico para la determinación del porcentaje de materia orgánica del fango:

- Meter 2 crisoles de cerámica a 105°C (>1hora). Sacar de la estufa y meter durante 30 minutos en desecador (con silica-gel). Pesar en balanza de precisión (dato “peso de crisol vacío”). Añadir 10ml de fango (bien agitado previamente) en cada crisol. Volver a pesar (dato “peso crisol + muestra húmeda”)
- Meter en estufa a 105°C destapados (>2 días). Sacar de la estufa, meter en desecador 30 minutos y pesar (dato “peso del crisol + sólidos totales”. Se repite la pesada varios días hasta que sea constante (diferencia < 0,0009 g) que suele obtenerse tras 2-3 días.
- Encender la mufla a 550°C (30 minutos antes de utilizar). Meter muestras en la mufla durante 4 horas a 550°C. Sacar de la mufla con cuidado y meter en estufa a 105°C (1 día).
- Sacar de la estufa y meter en desecador 30 minutos. Pesar en balanza de precisión (dato “peso crisol + cenizas”).
- Tendremos los datos por duplicado. Calcular media y desviación típica.

CÁLCULOS

En las expresiones Ec.III.11-Ec.III.14 se muestra el cálculo de diferentes parámetros de caracterización expresadas en porcentaje en base húmeda; es decir, respecto a la suma del contenido en agua y sólidos.

$$ST (\%) = 100 \times \frac{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra seca a } 105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{\text{crisol vacío}}}{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra húmeda}} - \text{Peso}_{\text{crisol vacío}}} \quad (\text{Ec. III. 11})$$

$$SNV (\%) = 100 \times \frac{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra seca a } 550^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{\text{crisol vacío}}}{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra húmeda}} - \text{Peso}_{\text{crisol vacío}}} \quad (\text{Ec. III. 12})$$

$$SV (\%) = ST (\%) - SNV (\%) \quad (\text{Ec. III. 13})$$

$$\text{Humedad} (\%) = 100 - ST (\%) \quad (\text{Ec. III. 14})$$

Donde:

ST = Sólidos totales (%)

SV = Sólidos volátiles o materia orgánica (%)

SNV = Sólidos no volátiles o cenizas (%)

Humedad = contenido en agua respecto al total (%)

Los pesos se expresan siempre en gramos y los porcentajes (%) son en base húmeda; es decir, respecto al total (agua más sólidos).

Por otra parte, se puede expresar el contenido en SV y SNV como porcentaje de los sólidos totales; es decir, referirlo al contenido en sólidos como se muestra en las expresiones Ec.III.15 y Ec.III.16.

$$SNV (\% \text{ en base seca}) = 100 \times \frac{SNV (\%)}{ST (\%)} \quad (\text{Ec. III. 15})$$

$$SV (\% \text{ en base seca}) = 100 - SNV (\% \text{ en base seca}) \quad (\text{Ec. III. 16})$$

Donde:

SV (% en base seca) = porcentaje de sólidos volátiles respecto a los sólidos totales

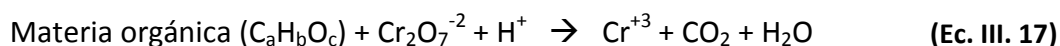
SNV (% en base seca) = porcentaje de sólidos no volátiles respecto a los sólidos totales

III.3.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno (DQO) es la cantidad equivalente de oxígeno que consumen las materias (orgánicas e inorgánicas) presentes en un agua cuando se oxidan a su mayor estado de oxidación. Es decir, la DQO constituye el consumo de oxígeno (mg/L) en la oxidación total mediante vía húmeda de la materia carbonácea. Por tanto, este ensayo permite medir el contenido en materia carbonácea en aguas naturales o residuales.

Para determinar el equivalente de oxígeno que puede ser oxidado, se utiliza un agente químico fuertemente oxidante en medio ácido (dicromato potásico, en este caso). El ensayo se realiza a temperaturas elevadas (150°C) y en presencia de sulfato de plata (catalizador) y sulfato de mercurio (inhibe las interferencias con el ion cloruro) para facilitar la oxidación de determinados tipos de compuestos.

La reacción química principal que tiene lugar se muestra en la ecuación III.17.



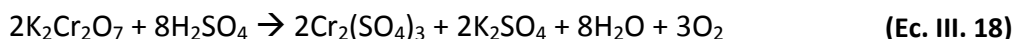
Cabe señalar que aunque la DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno) es el análisis más extendido, la DQO es más precisa ya que la oxidación química es más efectiva que la biológica. Además, es una analítica más rápida (3 horas de duración del análisis de DQO frente a 5 días para la DBO). Normalmente la relación DBO/DQO es de 0,4-0,8.

Este análisis se puede utilizar con muestras problema de pequeño volumen (2-3 ml), mediante reacción en tubos de ensayo con tapón de rosca para posibilitar que la digestión se pueda realizar bajo presión a 150°C durante dos horas. Este método ha sido aprobado por la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA).

El oxígeno se mide a partir del consumo del oxidante utilizado, por dos vías:

- Valoración directa del dicromato remanente
- Espectrofotometría, midiendo la extinción de su color amarillo-naranja, o por la generación de color verde azulado, debido al Cr⁺³ formado.

Las condiciones de la oxidación se deben a la acción combinada de un oxidante fuerte, dicromato, en medio sulfúrico y a temperatura elevada, durante un tiempo suficiente para completar la oxidación. En presencia de un reductor, que utilice el oxígeno liberado por el dicromato, la reacción completa del dicromato en medio sulfúrico se representa por:



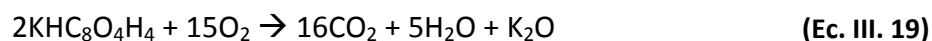
La reacción indica que por cada 2 moles de dicromato que se reducen, se generan 3 moles de oxígeno, para oxidar materia orgánica.

PATRÓN PARA LA MEDIDA DE LA DQO

Las sustancias químicamente puras, que únicamente se contaminan con agua o anhídrido carbónico del aire, y que por calentamiento lo desprenden sin descomponerse, obteniéndose así de nuevo el producto químicamente puro, reciben la denominación de patrones primarios, siendo estas sustancias las adecuadas para preparar disoluciones de concentración conocida.

El patrón primario utilizado para la determinación de la DQO es el hidrógeno-ftalato potásico, $\text{KHC}_8\text{O}_4\text{H}_4$, ya que calentando a 120°C el producto analítico responde a su fórmula, estando exento de impurezas.

La reacción de oxidación del hidrógeno-ftalato potásico se expresa como:



Esta reacción establece la base para el cálculo de disoluciones de DQO patrón. El problema es calcular la cantidad de hidrógeno-ftalato potásico necesaria para preparar, por ejemplo, un litro de disolución que contenga $1 \text{ mg de O}_2/\text{L}$ (DQO). El peso molecular del hidrógeno-ftalato potásico es 204,2 y el del oxígeno 32; la cantidad necesaria es:

$$\frac{2 \times 204,2}{15 \times 32} \times 500 = 425,4 \text{ mg} \quad (\text{Ec. III. 20})$$

Por tanto, una disolución de 425,4 mg/L de hidrógeno-ftalato potásico tiene una DQO de 500 mg/L.

Preparación del reactivo

Para el rango de medida de 150 a 1.500 mg/L, la preparación del reactivo de dicromato se explica a continuación:

- Disolver 8,166 g de dicromato ($K_2Cr_2O_7$) en 200 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 1 L.
- Disolver 10,0 g de sulfato de plata (Ag_2SO_4) en 600 ml de ácido sulfúrico concentrado en un vaso de precipitado de 2 L.
- Mezclar lentamente y con cuidado las dos disoluciones preparadas anteriormente, añadiendo la disolución ácida sobre la disolución de dicromato en el vaso de precipitado de 2 L. Como la dilución del sulfúrico es fuertemente exotérmica, hay que dejar enfriar la disolución entre adiciones, para evitar ebullición con proyección del contenido.
- La mezcla obtenida se lleva a un matraz aforado de 1 L y se enrasa con agua. En esta operación se vuelve a generar calor, por lo que se procederá a enfriar el matraz, y el enrase final se realizará con la disolución a 25°C.

Recta patrón

En la tabla III.6 se muestran los valores de DQO conocidos utilizados para la obtención de la recta patrón a partir de la medición de la absorbancia.

Tabla III. 6. Recta de calibrado para la medida de DQO (N=9).

DQO (mg O ₂ /L)	0	200	300	400	500	750	1.000	1.500	2.000
Absorbancia (620 nm)	0	0,065	0,092	0,113	0,145	0,215	0,278	0,449	0,539

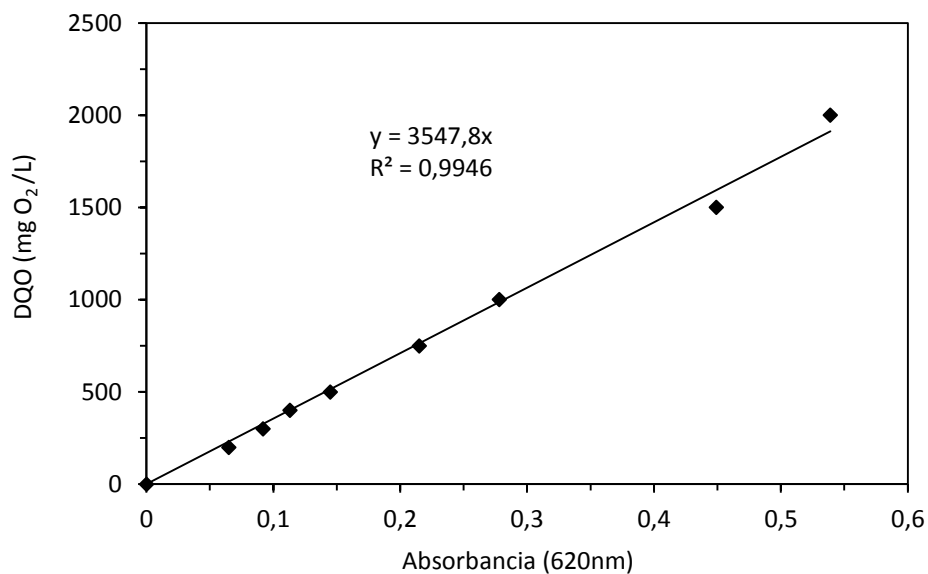


Figura III. 4. Recta de calibrado de DQO ($R = 0,995$). Nivel de confianza 95%, $N = 9$.

A partir de la representación gráfica (Figura III.4) se ajusta a la siguiente expresión:

$$y = a \cdot x + b$$

Donde:

$$y = \text{DQO (mg de O}_2\text{/L)}$$

$$a = 3.547,8$$

$$x = \text{Absorbancia a 620nm}$$

$$b = 0 \text{ (ordenada en el origen)}$$

PROCEDIMIENTO

Para determinar la DQO del fango, se procede de la siguiente manera:

- Realizar diluciones de la muestra en agua destilada en tubos falcon de 50ml:

Dilución 1:5 (DQO≈4). Para sobrenadantes que se obtienen mediante centrifugación del fango a 4.500 rpm durante 15 minutos.

Diluciones 1:10 y 1:25 (DQO≈50). Para el efluente global con una mayor carga orgánica.

Normalmente esta dilución se realiza volumen:volumen. Pero debido a la viscosidad del fango, la dilución se realiza en proporción peso:peso utilizando

una balanza de precisión y teniendo en cuenta que la densidad del agua y del fango son prácticamente iguales (1 g/ml).

- Añadir 3 ml de dicromato en un tubo de vidrio de 10 ml con tapón de rosca donde tendrá lugar la reacción.
- Agregar 1 cucharada enrasada de sulfato de mercurio III (HgSO_4).
- Adicionar 2 ml de la muestra diluida (puede ser muestra problema, agua destilada como blanco o muestra patrón para la recta de calibrado).
- Cerrar fuertemente y agitar.
- Colocar los tubos en un termobloque a 150°C durante 2 horas (digestión).
- Enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Medir la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotómetro.

Tras la reacción, debe verse amarillo-naranja o verde oliva. Si el color es verde fosforito o azulado, significa que está fuera de rango y hay que utilizar una dilución mayor.

CÁLCULOS

- Recta de calibrado (pendiente = 3.547,8 mg/L) válida para $0,100 < \text{Absorbancia} < 0,561$
- Sustituir el valor de la Absorbancia medida en la ecuación de la recta de calibrado
- $\text{DQO (mg/L)} = \text{Absorbancia} \times 3.547,8 \times \text{Factor de dilución}$
- $\text{DQO (g/L)} = \text{DQO (mg/L)} / 1.000$

III.3.3. CT, COT, CI, NT, NKT y NN

La determinación del carbono total (CT), carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT) y nitratos y nitritos (NN) se ha llevado a cabo en un analizador FormacsHT TOC/TN. A su vez, el nitrógeno Kjeldahl (NKT) se puede calcular por la diferencia entre el nitrógeno total (NT) y los nitratos y nitritos (NN).

$$CT = COT + CI \quad (\text{Ec. III. 21})$$

$$NT = NKT + NN \quad (\text{Ec. III. 22})$$

Este análisis se ha realizado para la caracterización de fangos del espesador secundario de diferentes fechas y para el seguimiento del cultivo en biorreactores; permitiendo determinar las fluctuaciones en carbono y nitrógeno para establecer cinéticas de degradación en relación con la actividad depredadora de *C. elegans*. Además, se el análisis se ha distinguido entre efluente global (biomasa + agua) y agua tratada (sobrenadante tras centrifugación). La biomasa incluye a la población de nematodos, durante el cultivo en biorreactores.

Para la determinación en el efluente global, se realiza la sonicación de 10 ml de muestra (en hielo) durante 5 minutos a máxima potencia; para evitar agregados o partículas de un mayor tamaño que puedan obstruir la columna. En la configuración de medición del aparato, se aplicará una dilución automática en una proporción 1:100.

Por otra parte, entre 15 y 20 ml de muestra serán centrifugadas durante 15 minutos a 4.500 rpm recogiendo un volumen final de 10 ml del sobrenadante. En la configuración de medición del aparato, se aplicará una dilución automática en una proporción 1:10.

En la recogida de la muestra del biorreactor, se fija el caudal de aire en 0,5 L/min, se detiene la agitación mecánica y, tras 10 segundos, se introduce una pipeta de 25 ml hasta la zona central del biorreactor. Diariamente, se recogen dos muestras en tubos Falcon de 50 ml: 10 ml para el análisis del efluente global y 15 ml para el agua tratada. Las muestras se congelan a -20°C y se analizarán al final de cada experimento.

III.3.4. Densidad (ρ)

La densidad del fango es un parámetro necesario para cálculos ciertos cálculos; por lo tanto, se ha determinado sistemáticamente para los fangos utilizados.

PROCEDIMIENTO

- Tarar en la balanza de precisión 1 vaso de precipitado de vidrio de 50 ml que contiene una pipeta de plástico vacía de 10 ml.
- Pipetear con precisión 10 ml de fango (bien agitado previamente). Retirar el fango existente por la parte exterior de la pipeta utilizando papel.
- Colocar la pipeta llena con fango dentro del vaso de precipitado. Pesar en balanza de precisión (dato "m").
- Repetir los pasos anteriores por triplicado. Calcular densidades, media y desviación típica.

CÁLCULOS

A partir de la ecuación III.23, se determina la densidad del fango.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{Ec. III. 23})$$

Donde:

ρ = densidad del fango (g/ml)

m = masa de fango (g)

V = volumen de fango 10 (ml)

III.3.5. Conductividad, pH y concentración de oxígeno

La determinación de los parámetros de conductividad eléctrica (CE), pH y concentración de oxígeno, se realizó con el aparato multi-paramétrico a una temperatura constante de 20°C.

Por una parte, el pH y la conductividad eléctrica se han determinado para la caracterización inicial de cada fango y en el seguimiento diario de los cultivos en biorreactores.

El pH es el índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución a partir de la medición de la concentración de iones de hidrógeno (H^+) mediante un potenciómetro (pH-metro).

La conductividad eléctrica, es la medida de la capacidad de una sustancia para dejar pasar la corriente eléctrica. En medios líquidos, se relaciona con la presencia de sales que al disociarse producen cationes y aniones que permiten el transporte de energía eléctrica cuando se aplica un campo eléctrico.

La toma de muestras en el biorreactor se realiza fijando el caudal de aireación en 0,5 L/min y deteniendo la agitación mecánica durante 10 segundos; tras los cuales se pipetea, desde la zona central del biorreactor, 3 ml del cultivo en tubos de plástico de 10 ml.

Para la determinación de la concentración de oxígeno disuelto (mg/L), se detiene la agitación mecánica y la aireación; seguidamente se introduce la sonda en el medio de cultivo en varias alturas del biorreactor in situ.

III.3.6. Metales pesados

Para determinar la concentración de diferentes trazas de metales pesados en el fango se aplicó el método de Espectrometría de Absorción Atómica (EAA) que consiste en medir la luz que absorbe un átomo en estado fundamental al pasar al estado excitado. Los análisis fueron realizados por la empresa BEFESA S.L.

III.4. Cuantificación de materia grasa

En este trabajo de investigación se ha cuantificado la materia grasa para muestras de nematodos y de fango mediante el método Soxhlet. Este método consiste en la extracción sólido-líquido utilizando un disolvente apolar (en este caso hexano PAI).

PROCEDIMIENTO

A) *Obtención de la muestra:*

- Crecer los nematodos según las condiciones especificadas en cada experimento ya sea a partir de S-Medio o de fango.
- Concentrar la muestra en tubos de 15 ml.
- Lavar los nematodos adicionando agua mili-Q, centrifugando a 1.000 rpm durante 1 minuto y eliminando el sobrenadante. Repetir dos veces.
- Realizar un gradiente de sacarosa para una mayor purificación de la muestra de nematodos.
- Recoger los precipitados y adicionarlos en un tubo Falcon de 50 ml. Congelar a una temperatura de -20°C.
- Para la determinación de la materia grasa en muestras de fango, no son necesarios los pasos anteriores de cultivo y purificación. Se utilizan directamente 200 ml de fango del espesador secundario.

En los experimentos que se pretende obtener poblaciones de *C. elegans* para la estirpe *daf-2(e1370)* con un elevado porcentaje de dauer, se crece el cultivo en matraces en orbital rotatorio a 16°C; cuando la población alcanza la saturación (50.000 nematodos/ml) se concentran los nematodos mediante centrifugación (2.000 rpm durante 1 minuto), se adiciona nuevo S-Medio y se incuban a 25°C (temperatura de inducción de dauer para este mutante). Finalmente recoger la muestra y realizar protocolo de extracción de materia grasa.

B) Extracción por método Soxhlet:

- Meter a 105°C durante un día: un vaso de precipitado de vidrio de 20 ml (para muestras de nematodos) o de 200 ml (para muestra de fango) y un matraz aforado de 100 ml. Poner en desecador durante 30 minutos y pesar el matraz aforado en una balanza de precisión. Adicionar la muestra en el vaso de precipitado y volver a meter a 105°C para su secado que tendrá una duración de entre 1 y 3 días dependiendo del volumen de muestra.
- Cuando la muestra esté totalmente seca, se tritura usando una espátula de metal (lavada previamente con hexano para evitar contaminaciones con lípidos). Mantener en el desecador durante 30 minutos.
- Doblar en forma de acordeón cónico un papel de filtro circular Whatman y pesar. Colocar la muestra en el papel Whatman y pesar para conocer el peso exacto de la muestra.
- Poner un segundo papel Whatman doblado en acordeón cónico rodeando al que contiene la muestra (para evitar problemas si se produjese rotura del primer filtro). Colocar en el cuerpo extractor.
- Añadir en el matraz aforado aproximadamente unos 70 ml de hexano PAI y poner placa calefactora bajo el matraz; ajustar la temperatura de tal forma que el hexano se evapore lentamente y se condense a una velocidad de 2-3 gotas por segundo.
- Realizar la extracción en continuo durante 24 horas (en 3 horas se extrae el 99% de la materia grasa), manteniendo la temperatura del condensador constante en 20°C bombeando agua a través del serpentín. Tras 24 horas, recuperar el hexano mediante evaporaciones y condensaciones dejando aproximadamente 1-2 ml de hexano en el matraz aforado para evitar que se queme la materia grasa. Meter en estufa a 105°C un mínimo de 3 horas. Finalmente, poner en desecador durante 30 minutos y pesar el matraz y la materia grasa que contiene en balanza de precisión.

CÁLCULOS

Para determinar el contenido en materia grasa de la muestra, se siguen los cálculos mostrados en las ecuaciones III.24 y III.25 expresándose como porcentaje en peso seco.

$$Peso_{(muestra\ seca)} = \frac{Peso_{(Whatman+muestra\ seca)} - Peso_{(Whatman\ vacío)}}{Peso_{(muestra\ seca)}} \quad (\text{Ec. III.24})$$

$$Grasa\ (\%) = 100 \times \frac{Peso_{(matraz+grasa)} - Peso_{(matraz\ vacío)} - Blanco_{(Whatman)}}{Peso_{(muestra\ seca)}} \quad (\text{Ec. III.25})$$

Donde:

Blanco_(Whatman) = 0,0016 ± 0,0001 g (Promedio obtenido a partir de 4 extracciones Soxhlet con papel de filtro Whatman sin muestra).

Para la obtención de poblaciones de nematodos con un elevado porcentaje de dauer para la estirpe *daf-2(e1370)*, se crece el cultivo en matraces en orbital rotatorio a 16°C; cuando la población alcanza la saturación (50.000 nematodos/ml) se concentran los nematodos mediante centrifugación (2.000 rpm durante 1 minuto), se adiciona nuevo S-Medio y se incuban a 25°C (temperatura de inducción de dauer para este mutante). Finalmente recoger la muestra y realizar protocolo de extracción de materia grasa.

III.5. Caracterización de la materia grasa

Para la caracterización de los ácidos grasos presentes en la materia grasa del nematodo, se realizan los siguientes procedimientos:

- A) Extracción lipídica
- B) Transesterificación
- C) Análisis mediante cromatografía de gases

A) Extracción de lípidos:

- En un matraz con unos 20 ml de S-Medio se cultivan los nematodos; controlando hasta que la población alcance unos 30.000 nematodos/ml. Evitar alcanzar 50.000 nematodos/ml ya que puede haber déficit nutricional y consumir las reservas de materia grasa.

En los experimentos con nematodos crecidos en fango, el nematodo se crece en placas de agar o en matraces de 100 ml con 20 ml de fango, luego se realizan varios lavados con agua mili-Q mediante centrifugaciones para reducir la presencia de fango. En este paso la pérdida de biomasa de nematodos es elevada por lo que hay que partir de una mayor cantidad que en cultivos con *E. coli*; teniendo en cuenta que para realizar la caracterización, es suficiente con una biomasa de 300.000 nematodos totales.

- Realizar gradiente de sacarosa para separar el nematodo del medio de cultivo.
- Traspasar los nematodos a tubos de vidrio.
- Centrifugar a 2.000 rpm durante 1 minuto y dejar el precipitado de nematodos.
- Congelar a -20°C (si se desea almacenar la muestra en este punto).
- Descongelar la muestra
- Adicionar:

1,25 ml de cloroformo (CHCl_3)

2,50 ml de metanol (MeOH)

- Agitar en vórtex
- Adicionar 1,25 ml de cloroformo y agitar en vórtex

- Añadir 1,25 ml de agua mili-Q y agitar en vórtex
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para dejar 2 fases (acuosa y orgánica).
- Recoger la fase del fondo del tubo (orgánica) metiendo una pipeta Pasteur de vidrio hasta el fondo y recogiendo dicha fase fase (evitar coger más del 90% de la fracción).

B) Transmetilación:

- Mezclar:

975 µl de metanol

25 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 96% v/v

- Incubar durante 1 hora a 80°C (en un baño calefactor o en termobloque). Tapar y poner parafilm para evitar evaporaciones. Quitar parafilm tras 50 minutos.

- Adicionar:

200 µl de hexano

1,5 ml de H₂O mili-Q

- Centrifugar a baja velocidad (1 pulso hasta llegar a 1.000 rpm) y recoger 200 µl de la parte superior que se conservan en un eppendorf de vidrio opaco mediante congelación a -20°C.

C) Cromatografía de gases:

La materia grasa extraída ha sido analizada en el Instituto de la Grasa (Sevilla) mediante cromatografía de gases utilizando el equipo: "Hewlett–157 Packard 6890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA)". A partir del perfil de picos, se determinó la proporción relativa de cada ácido graso en la fracción lipídica extraída.

Las muestras se prepararon según el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959).

III.6. Determinación de la relación número de nematodos-peso seco por gravimetría.

El objetivo de esta determinación, ha sido establecer una relación entre el número de nematodos y su peso seco; es decir, conocer el peso de un nematodo o, expresado de otra manera, cuántos nematodos pesan 1 miligramo. La población de nematodos estará en saturación para que represente la situación poblacional real cuando se alcanza el máximo número de individuos en el cultivo; es decir, 90% de larvas L1 y L2, algunos dauers e internal hatching.

Para ello, se realiza un cultivo de nematodos en 300 placas de agar de 8 cm de diámetro, cuya única fuente de carbono sea el fango. Los nematodos se recogen mediante adición de agua mili-Q a la placa, se raspa suavemente con la punta de la pipeta y se pipetea para adicionarlos en tubos de 15 ml que se centrifugan durante 1 minuto a 2.000 rpm eliminando el sobrenadante. Repetir sucesivamente para ir concentrando los nematodos en 4-6 tubos. Realizar un gradiente de sacarosa y varios lavados con agua mili-Q. Finalmente, realizar el conteo de nematodos en un porta utilizando la lupa (5 veces por tubo).

Una vez conocido el número total de nematodos. Se coge un vaso de precipitado de 20 ml que ha estado previamente a 105°C durante 1 día, como mínimo. Se mete en el desecador durante 30 minutos, tras los cuales se pesa vacío en la balanza de precisión y se adiciona la muestra realizando varios enjuagues con agua para evitar pérdidas de nematodos en el tubo. Se vuelve a meter a 105°C y se pesan tras 24, 48, 72 y 96 horas hasta que la pesada sea constante (variación inferior a 0,0009 g). Por último, se realizan los cálculos según las ecuaciones III.26 y III.27 que muestran la relación existente entre el número de nematodos y su peso seco.

CÁLCULOS

La determinación del peso seco de un nematodo y el número de nematodos que equivalen a un miligramo de peso seco, se obtienen a partir de las ecuaciones III.26 y III.27, respectivamente.

$$Peso_{1\text{ nematodo}} = \frac{Peso_{(vaso+nematodos\ secos)} - Peso_{(vaso\ vacío)}}{N^{\circ}\text{ de nematodos totales}} \quad (\text{Ec. III. 26})$$

$$\frac{N^{\circ}\text{ de nematodos}}{1\text{ mg}} = \frac{1\text{ g}}{1.000\text{ mg}} \times \frac{N^{\circ}\text{ de nematodos totales}}{Peso_{(vaso+nematodos\ secos)} - Peso_{(vaso\ vacío)}} \quad (\text{Ec. III. 27})$$

III.7. Número de nematodos en función de peso seco, materia orgánica, carbono total, carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

Para determinar la equivalencia entre el número de nematodos, su peso seco y el carbono total, se ha realizado una recta de calibrado para un número de nematodos conocido.

El objetivo es establecer una relación con la medida del COT ya que la cantidad de muestra necesaria es varios órdenes de magnitud menor que la muestra determinada por gravimetría; con lo cual se podría hacer un seguimiento diario en los cultivos en biorreactores para aportar más información sobre la biomasa total de nematodo.

PROCEDIMIENTO

Se realizó el cultivo del nematodo en 100 ml de S-Medio en matraces de orbital rotatorio a 20°C y 170 rpm. La población alcanzó unos niveles próximos a 50.000 nematodos/ml observándose aproximadamente: 90% de L1 y L2, 5% adultos y 5% de dauers. Seguidamente, se separaron los nematodos del medio de cultivo realizando un gradiente de sacarosa en 6 tubos de 15 ml. Se lava la muestra adicionando agua mili-Q en los 6 tubos con el precipitado de nematodo obtenido tras el gradiente de sacarosa, se centrifuga (2.000 rpm durante 1 minuto) y se elimina el sobrenadante. Repetir el lavado tres veces.

Los 6 tubos se unificaron en un Falcon que se enrasa hasta 50 ml con agua mili-Q. Durante el proceso de separación y lavados se producen pérdidas de nematodos, por lo que se realizó un nuevo conteo para determinar el número exacto tras los lavados; obteniéndose $1,02 \cdot 10^6$ nematodos totales. De los 50 ml, se utilizan 17 ml (346.800 nematodos) para determinar los sólidos totales en peso seco respecto al número de nematodos; lo cual se realizó mediante secado a 105°C (equivalente al protocolo de determinación de sólidos totales).

El resto de la muestra se distribuyó en tubos de vidrio (resistentes a congelación) de 10 ml añadiendo un volumen proporcional para obtener una gradación de número de nematodos entre 100 y 200.000 nematodos por tubo; se enrasan todos los tubos hasta 10 ml con agua mili-Q y se congelan a -20°C. Para cada condición, se utilizaron 2 réplicas.

Las muestras se descongelan a en hielo a 4°C y se sonicen en hielo (150 segundos a potencia máxima). A través de la observación en lupa estereoscópica se comprueba la rotura de los nematodos por este proceso.

Las muestras son traspasadas mediante volcado en los tubos específicos del analizador FormacsHT TOC/TN para la determinación de los valores de CT, COT, CI, NT y NN. No se realizarán diluciones y la configuración utilizada es “Hight”.

CÁLCULOS

Mediante gravimetría se ha determinado del peso seco de un nematodo como se muestra en la siguiente expresión:

$$Peso_{1\text{ nematodo}} = \frac{Peso_{(vaso+nematodos\ secos)} - Peso_{(vaso\ vacío)}}{N^{\circ}\text{ de nematodos totales}} \quad (\text{Ec. III. 28})$$

Donde:

$$N^{\circ}\text{ de nematodos totales} = 346.800$$

Por tanto, se puede calcular el peso seco correspondiente al número de nematodos en cada muestra (100, 200, 1.000, 2.000, 5.000, 10.380, 20.760, 31.140, 51.900, 40.800, 81.600 y 102.000 nematodos) según la ecuación III.29.

$$N^{\circ}\text{ de nematodos por muestra} \times Peso_{1\text{ nematodo}} = Peso_{\text{nematodos totales por muestra}} \quad (\text{Ec. III. 29})$$

Finalmente, se representan gráficamente los valores del peso seco de los nematodos frente al valor de carbono total medio en el aparato TOC; se realiza una regresión lineal y se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = a \cdot x \pm b \quad (\text{Ec. III. 30})$$

Donde:

y = carbono orgánico total (CT, mg/L)

a = pendiente (constante determinada mediante la regresión de la recta de calibración)

x = $Peso_{\text{nematodos totales por muestra}}$

b = 0 (ordenada en el origen)

Por tanto, a partir de la ecuación III.30 y midiendo el carbono total en el aparato TOC se puede extrapolar y determinar el número de nematodos y el contenido en sólidos totales en una pequeña muestra del cultivo en biorreactores; es decir, biomasa en peso seco.

De la misma manera que se ha procedido para el CT, se ha realizado con las medidas de COT, CI y NT obteniendo sus respectivas rectas de calibrado.

III.8. Conversión de materia orgánica de fango en nematodo

La materia orgánica constituye la fracción sólida que puede utilizar el nematodo como alimento, por lo que parámetros como los sólidos volátiles (SV) o el carbono orgánico total (COT), permiten conocer la cantidad de residuo potencialmente digerible por el nematodo; lo cual se ha denominado en este trabajo como: “conversión de materia orgánica de fango en nematodo” y se expresa en porcentaje (%).

El seguimiento del crecimiento de la población de *C. elegans*, se realiza a través del conteo de nematodos; por lo tanto, mediante la relación entre el número de nematodos y su peso seco se puede determinar la conversión de materia orgánica; es decir, los gramos de fango que son convertidos en gramos de nematodo. Este parámetro se calcula como se muestra en las siguientes expresiones:

$$\text{Conversión de SV (\%)} = \frac{\text{mg de nematodo/ml de fango}}{\text{SV (mg/ml de fango)}} \times 100 \quad (\text{Ec. III. 31})$$

A partir de las ecuaciones:

$$\text{SV (mg/ml de fango)} = \rho \times \frac{\text{SV(\%)}}{100} \times 1000 \quad (\text{Ec. III. 32})$$

$$\frac{\text{mg de nematodo}}{\text{ml de fango}} = \frac{\text{Nº de nematodos/ml de fango}}{\text{Nº de nematodos/mg de peso seco}} \quad (\text{Ec. III. 33})$$

$$\frac{\text{Nº de nematodos}}{\text{ml de fango}} = \frac{\text{Nº de nematodos}}{\text{ml de cultivo}} \times \frac{1}{F_d} \quad (\text{Ec. III. 34})$$

Donde:

SV = sólidos volátiles (materia orgánica)

ρ = densidad del fango

Nº de nematodos/mg de peso seco = 23.874

F_d = factor de dilución (volumen de fango/volumen total del cultivo)

III.9. Pretratamientos del fango

En este trabajo de investigación se ha estudiado el efecto de los siguientes pretratamientos del fango: choque térmico, sonicación y microondas.

III.9.1. Choque térmico

Para el pretratamiento mediante choque térmico, se adicionan 200 ml de fango en botes de vidrio de 250 ml (el tapón se cubre con parafilm para evitar salida o entrada de agua). Seguidamente se coloca en un baño calefactor lleno de agua y se aplican diferentes temperaturas y tiempos en función del experimento. En este trabajo de investigación las temperaturas ensayadas han sido 40, 80 y 100°C durante 3 minutos. Tras el tratamiento térmico, es imprescindible que la muestra se atempere durante unos 30 minutos antes de distribuirla en los matraces e inocular el nematodo (protocolo de cultivo en fango en matraces en orbital rotatorio).

III.9.2. Sonicación

La sonicación consiste en la aplicación de ondas ultrasónicas que pueden producir roturas de filamentos o agregados del fango que, tal vez, incremente su potencial como alimento para *C. elegans*.

El fango se adiciona en tubos Falcon de 50 ml con 20 ml de muestra y se mantiene en hielo mientras es sonicada. Se pueden aplicar diferentes porcentajes de potencia y tiempos. Concretamente en este trabajo de investigación se han aplicado potencias del 50 o 100% y tiempos de 60, 120 o 180 segundos. Finalmente, la muestra se atempera durante unos 30 minutos antes de distribuirla en los matraces e inocular el nematodo (protocolo de cultivo en fango en matraces en orbital rotatorio).

III.9.3. Microondas

Las ondas electromagnéticas producen una alteración en las moléculas de agua calentando la muestra y generando cambios en la misma. En este caso, se adicionan 200 ml de fango en un bote de vidrio de 250 ml, se mantiene fija la potencia del microondas en 700 vatios y se modifica el factor tiempo (60, 120 y 180 segundos). De igual manera que en los pretratamientos anteriores, el fango se tiene que atemperar durante unos 30 minutos antes de adicionarla en los matraces e inocular el nematodo (protocolo de cultivo en fango en matraces en orbital rotatorio).

III.10. Decantación del fango de recirculación biológica

El fango de recirculación biológica tiene un bajo contenido en sólidos por lo que se han realizado experimentos incrementado la concentración de sólidos totales mediante decantación.

PROCEDIMIENTO

Adicionar un volumen determinado de fango de recirculación biológica (200-1.000 ml) en botes de vidrio de entre 250 y 1.000 ml. Se decanta a una temperatura de 4°C durante diferentes periodos de tiempo según el experimento (mínimo 7 horas y máximo 216 horas). Una vez transcurrido el tiempo de decantación, se retira el sobrenadante evitando generar turbulencias para mantener el volumen precipitado; lo cual queda referido como la siguiente expresión:

$$\frac{\text{volumen de fango decantado}}{\text{volumen total inicial}} \quad (\text{Ec. III. 35})$$

III.11. Análisis estadístico

Para la comparación entre dos condiciones de un mismo experimento, se ha utilizado el test estadístico prueba T-Student. Aplicando un nivel de confianza del 95%; es decir, para p-valor < 0,05 se acepta la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre las dos condiciones comparadas; lo cual se simbolizará con un asterisco (*) en las gráficas.

III.12. Microscopía

Las capturas de imágenes del nematodo se hicieron con un microscopio estereoscópico Olympus SZX16. Software: Cella.

Las observaciones del de los cultivos a nivel microbiológico se realizaron con el microscopio Nikon YS2-HF.

III.13. ANEXO (equipos, reactivos y materiales)**III.13.1. Equipos**

Los equipos utilizados durante este trabajo de investigación se recogen en la tabla III.7 y III.8.

Tabla III. 7. Listado de los equipos utilizados durante este trabajo experimental.

Equipo	Marca	Modelo	Especificaciones
<i>Mantenimiento rutinario</i>			
Agitador orbital incubador	INFORS AG	Microtron	
Estufa	SELECTA		
Estufa incubadora	Memmert		
Centrífuga	KENDRO	Multifuge 3 S-R	
Botes de 750 ml	Thermo Scientific		PP 750 mL 100x136 mm
Autoclave	SELECTA	Presoclave 75	
Cabina de flujo laminar	STERIL	HELIOS 48 C	230 V 50Hz 8 A
Mechero Bunsen	Usbeck		
Asa de siembra microbiológica	Leica		
Vórtex	VELP-SCIENTIFICA		
Termobloque	GRANT-BOEKEL	BBD2	
Congelador -80°C	New Brunswick	Premium U410	
Congelador -20°C	ZANUSSI		
Frigorífico 4°C	LIEBHERR		

Tabla III. 8. Equipos utilizados durante este trabajo experimental.

Equipo	Marca	Modelo	Especificaciones
Instalación de biorreactores			
Reactor cilíndrico 1L	POBEL		CAPACIDAD (1000 ml), Ø INT. BOCA (100mm), Ø EXT. BOCA (130/105 mm), altura (245 mm), conector (GL-18)
Tapadera	POBEL		Ø INTERIOR BOCA (100mm), diámetro (110 mm), boca central (29/32 mm), boca lateral inclinada (29/32)
Abrazadera	POBEL		Ø INTERIOR BOCA (100 mm)
Juntas de silicona	POBEL		Ø INTERIOR BOCA (100 mm)
Tapones de vidrio	POBEL		29/32
Agitador magnético	VELP SCIENTIFICA	ARE Heating	
Barra imantada	IKA	IKAFLON® 40 Set	Dimensiones (L x Ø): 40 x 8 mm; revestimiento de PTFE
Cabeza agitadora	IKA	RW 20 digital	Rango 260-2.000 rpm
Cabeza agitadora	Heidolph	RZR 2041	Rango 40-2.000 rpm
Varilla agitadora de hélice	IKA	R 1342	4-palas. Longitud (350 mm), diámetro del eje (8 mm), diámetro de agitador (50 mm)
Varilla agitadora tipo "U"	FISHER		Polipropileno
Varilla agitadora tipo Rushton	Heidolph		Acero inoxidable (AISI 316L), tamaño de la pala: diámetro 29 mm, longitud 400 mm, Ø eje 8 mm, velocidad máxima de 2.000 rpm.
Aspas superficiales de PVC			
Difusores poro 2	AFORA	V-66992	
Difusores poro 2	FISHER	V67374	
Bomba de aire	Aqua-medic	Mistral 4000	Capacidad máxima 4.000 L/h
Frasco lavador de gases	AFORA	5224/2	500 ml
Soporte para rotámetros	AALBORG		
Rotámetros	AALBORG	0-5 ± 0,1 L/min	Rango de caudal de aire: 0-5
Baño de agua	SELECTA		
Condensador de dedo frío	SELECTA		
Cabeza calefactora	SELECTA	TECTRON BIO	

Continuación Tabla III. 8.

Equipo	Marca	Modelo	Especificaciones
Caracterizaciones			
Espectrofotómetro UV-Visible	Thermo Scientific	EVOLUTION 201	
Analizador FormacsHT TOC/TN	SKALAR		
Mufla	CARBOLITE	AAF 1100	
Crisol porcelana	HALDENWANGER	Crisol GOOCH de Porcelana	Forma alta Tipo1 24 ml. 35 mm. 44 mm. ET-0022
Balanza de precisión	DENVER	SI-234	Max. 230g d=0,1mg
Balanza granatario	ADAM	Nimbus NBL	Max. 1.600 g d=0,01g
Desecador	POBEL		Boca GL-36
Medidor multi-paramétrico	EUTECH INSTRUMENTS	PCD650	Sondas: pH, conductímetro y oxímetro
Espectrometría (EAA)			
Análisis de la materia grasa			
Cuerpo extractor	POBEL		50ml; 29/32 y 19/26
Refrigerantes Dimroth	POBEL		29/32
Matraz de fondo plano	POBEL		100ml; 19/26; 100 ml
Espátula de acero inoxidable	POBEL		Semi-micro-doble plana 140 mm
Cápsula porosa	POBEL		Porosidad 1
Cromatógrafo de gases	Agilent	Hewlett-157	
Pretratamientos			
Sonicador	BANDELIN SONOPULS	HD 2070	Rango de amplitud = 20-100%
Microondas	Balay	3WM 1918	Potencia máxima 800 W
Baño calefactor	BUCHI	B-491	
Microscopía			
Lupa estereoscópica	NIKON	SMZ645	Lupa estereoscópica
Oculares lupa estereoscópica	NIKON	C-W10xB/22	Oculares lupa estereoscópica
Lámpara de mercurio	NIKON	C-DS	Lámpara de mercurio
Potenciador de luz	NIKON	TN-PSE30	Potenciador de luz
Microscopio estereoscópico	Olympus	SZX16	Microscopio estereoscópico
Cámara microscopio	Olympus	DP73//U-	Cámara microscopio
Microscopio	NIKON	YS2-HF	Microscopio
Cámara	NIKON		Cámara
Softwares			
Software: Cella			
TOC			
Cálculos y estadísticas	Microsoft Office		Excel 2010
GraphPad Prism 5	GraphPad Software,		
OriginPro 8.0			Ajustes modelos matemáticos

III.13.2. Reactivos y materiales

Los reactivos y materiales utilizados durante la experimentación se detallan en la tabla III.9.

Tabla III. 9. Listado de los reactivos y materiales utilizados durante este trabajo experimental.

Reactivo/material	Marca	Especificaciones
Medios de cultivo y mantenimiento		
Peptona	BD (Difco)	
Agar bacteriológico europeo	Pronadisa	
Agua calidad mili-Q estéril	Millipore Q-POD	Filtro 0,22µm
Etanol Absoluto	Merk-Ensure	PA ACS ISO 99,8%
Tryptona	Pronadisa	
Extracto de levadura	Pronadisa	
Di-Sodio hidrógeno fosfato	Merk-Emsure	
Tri-potasio citrato 1-hydrate	Sharlau	
Sodio Cloruro	EMSURE	ACS, ISO, Reag. Ph Eur
Potasio Di-Hidrógeno Fosfato		
Di-Potasio hidrógeno fosfato 3-hidrato		
Colesterol	SIGMA	>99%
Calcio Cloruro 2-hidrato	Panreac	PA-ACS
Sulfato de Magnesio 7-hidrato	Panreac	PA-ACS
Sulfato de hierro 7-hidrato	Panreac	PRS
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate		
Manganeso cloruro 4-hidrato	Panreac	ACS
Sulfato de cobre 5-hidrato	Panreac	PA
Placas Petri de 60 mm	Greiner	60 mm
Placas petri 10 cm	Cosela	10 cm
D(+)-Sacarosa	Sharlab	Para análisis, Reag. Ph Eur
Portaobjetos	AX	Esmerilado b/mate c/50
Platino	Dicsa	Grosor 0,25 mm 90% de platino y 10% de iridio
Tubos y otros		
Tubos de 10 ml		
Tubos de 15 ml	Sarstedt	Tapón amarillo PS-FC-TRM-EST
Tubos de 50 ml	Greiner	PP sin faldilla tapón azul
Tubos de 10 ml TOC		
Tubos de 10 ml DQO (tapón de rosca)		
Tubos tipo eppendorf	Daslab	2 mL C/T NRC
Algodón		
Botes de vidrio	Boro	
Probetas	Boro	
Matraces	Boro	

Continuación Tabla III. 9.

Reactivo/material	Marca	Especificaciones
Pipetas		
Micropipeta P1000 µl	HTL	P1000 µl MICROPIPETAS HTL, V. VARIABLE C/ EXPULSO
Micropipeta P200 µl	HTL	P200 µl MICROPIPETAS HTL, V. VARIABLE C/ EXPULSO
Micropipeta P20 µl	HTL	P20 µl MICROPIPETAS HTL, V. VARIABLE C/ EXPULSO
Pipeta serológica de 5 ml	Sarstedt	Estéril
Pipeta serológica de 10 ml	Sarstedt	Estéril
Pipeta serológica de 25 ml	Sarstedt	Estéril
Aspirador para pipetas	Labox	Aspirador para pipetas Easy 8, 25 ml
Análisis DQO		
Dicromato potásico	ACROS	99,5% para análisis
Sulfato de plata en ácido sulfúrico	PANREAC	6,6 g/L en ácido sulfúrico
Sulfato de plata		
Cubeta de espectrofotómetro		
Sulfato de mercurio III		
Hidrógeno ftalato potásico	ACROS	ACS
Antiespumantes		
Antiespumante 204	Sigma	
Antiespumante A concentrado	Sigma	
Propilenglicol (disolvente)	Sigma-Aldrich	
Antiespumante AFC 5610	HANSA-CHT	
Antiespumante EVESCOL	Ilgar	
Extracción y caracterización de la materia grasa		
Hexano	Panreac	Calidad PAI
Lana de Vidrio	Panreac	Calidad QP
Papel de filtro cualitativo	Whatman	Calidad 1. Circulares con $\varnothing = 150$ mm
Cloroformo	Sigma-Aldrich	Puriss. p.a., ACS reagent, $\geq 99.8\%$ (chloroform + ethanol, GC)
Metanol	Sharlau	P. HPLC "RS"
Ácido Sulfúrico	Panreac	95-98% para análisis, ACS, ISO
Parafilm	Pechiney	
Tubos de vidrio con tapón de rosca		
Tubos opacos de 2 ml con tapón teflón		

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Este trabajo de investigación se ha realizado en dos etapas bien diferenciadas. En la primera, se ha estudiado la viabilidad y reproducibilidad del crecimiento de *Caenorhabditis elegans* en fango de la EDAR de referencia (Copero, Sevilla); el objetivo principal ha sido obtener un elevado crecimiento poblacional del nematodo independientemente del efecto de este crecimiento sobre el fango. Además, se ha realizado la cuantificación y caracterización de materia grasa del nematodo.

Los experimentos se han llevado a cabo en medio sólido (placa de Petri), medio líquido en orbital rotatorio (matraz Erlenmeyer con 20 ml de fango) y en biorreactores de 1 L de volumen de trabajo.

En la segunda etapa, se han realizado tres series experimentales utilizando biorreactores de 1 L de capacidad de trabajo. Estas series han permitido abordar el estudio de los siguientes parámetros:

- Efecto de la concentración inicial de sustrato (fango)
- Efecto de la aireación
- Influencia de la agitación mecánica

IV.1. Caracterización y elección de los fangos generados por la EDAR

IV.1.1. Caracterización de los fangos generados en la EDAR

En el proceso de depuración de aguas residuales se generan diversos fangos con distintas características físico-químicas (Figura I.5). Para evaluar qué tipo de fango es el más adecuado como medio de cultivo de *C. elegans*, se han caracterizado (Tabla IV.1) los siguientes fangos de la EDAR de referencia (Copero, Sevilla):

- Fango del espesador secundario o de flotación (Esp. 2º)
- Fango del espesador primario o de gravedad (Esp. 1º)
- Fango de la cámara de mezcla (C.M.)
- Fango de recirculación biológica (Rec. bio.)
- Fango del digestor anaerobio (Dig.)

Tabla IV. 1. Caracterización de los cinco fangos procedentes de la EDAR de referencia preseleccionados para el cultivo del nematodo *C. elegans*. Efluente global (fangos del 15-octubre-2014). Los parámetros estudiados son: sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), sólidos no volátiles (SNV), demanda química de oxígeno (DQO), pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT), carbono total (CT), carbono inorgánico (CI) y nitrógeno total (NT).

Parámetro	Tipo de fango				
	Esp. 2º	Esp. 1º	C.M.	Rec. bio.	Dig.
ST (%)	3,38	0,540	3,91	0,283	1,83
SV (%)	2,58	0,309	2,29	0,191	1,27
SNV (%)	0,807	0,232	1,62	0,0925	0,555
DQO (g/L)	30,8	4,86	35,2	2,55	15,5
pH	6,30	6,94	5,79	7,07	7,16
CE (mS/cm)	1,61	1,82	2,05	1,11	5,59
COT (mg/L)	9.970 (551)*	848 (231)*	9.843 (1.061)*	640 (72,8)*	5.253 (594)*
CT (mg/L)	10.403 (597)*	927 (300)*	10.246 (1.110)*	702 (122)*	5.844 (1.046)*
CI (mg/L)	434 (86,6)*	79,6 (69,6)*	403 (49,6)*	62,4 (49,2)*	591 (452)*
NT (mg/L)	2.351 (181)*	162 (53,6)*	1.692 (204)*	167 (28,9)*	1.534 (684)*

*Valor en la fase líquida (sobrenadante obtenido mediante centrifugación del efluente global).

También se determinó la concentración de diferentes metales pesados en los fangos mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (Tabla IV.2).

Tabla IV. 2. Concentración de los metales pesados determinados en diferentes tipos de fango. Efluente global. Fango de 20-septiembre-2011.

Metal	[Metal] en el fango (mg/L)				
	Esp. 2°	Esp. 1°	C.M.	Rec. bio.	Dig.
Cu	3,37	3,52	< 0,100	< 0,010	6,12
Cd	0,100	< 0,100	< 0,100	< 0,100	< 0,100
Mn	0,990	1,63	0,790	0,200	3,47
Zn	5,22	11,2	< 0,100	< 0,100	22,9
Fe	87,8	223	68,8	< 0,100	680
Pb	0,610	1,09	0,250	0,210	1,59
Cr	0,100	< 0,100	< 0,100	< 0,100	< 0,100
Ni	0,600	0,440	0,180	0,290	0,710
Tl	0,590	0,560	0,590	1,03	0,480

IV.1.2. Elección del fango para el cultivo de *C. elegans*

Para la selección del fango más apropiado para el cultivo de *C. elegans*, se ha estudiado el crecimiento del nematodo utilizando como medio de cultivo los cinco fangos diferentes que han sido caracterizados previamente (Tabla IV.1).

En las tablas IV.3 y IV.4 se observa el crecimiento de la población de nematodos obtenido en placas de agar y matraces Erlenmeyer, respectivamente, para diferentes concentraciones de fango.

Tabla IV. 3. Crecimiento máximo de la población de nematodos, a partir de los cinco fangos seleccionados, obtenido en placas de agar para diferentes concentraciones. Fango del 20-septiembre-2011.

Tipo de fango	[Fango] (% v/v)	Nematodos/placa	± DS
Esp. 2 ^o	100	172.275	23.475
	50	166.199	39.600
	10	72.300	9.300
	2	124.200	52.200
	1	55.494	11.700
Esp. 1 ^o	100	94.493	25.508
	50	96.792	12.000
	10	66.294	22.500
	2	30.600	-
	1	26.700	2.100
C.M.	100	42.601	1.800
	50	39.666	3.000
	10	32.100	8.700
	2	25.799	-
	1	20.700	3.000
Rec. bio.	100	180.736	38.234
	50	44.100	11.700
	10	31.800	6.000
	2	14.400	-
	1	19.201	-
Dig.	100	40.660	12.000
	50	21.901	4.500
	10	23.250	750
	2	9.000	-
	1	9.675	2.025

Tabla IV. 4. Crecimiento máximo de la población de nematodos, a partir de los cinco fangos seleccionados, obtenido en matraces Erlenmeyer en orbital rotatorio para diferentes concentraciones. Fango del 20-septiembre-2011.

Tipo de fango	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml
Esp. 2°	100	45.200
	50	4.200
	20	667
	10	367
Esp. 1°	100	9.732
	50	5.466
C.M.	100	933
	50	483
Rec. bio.	100	966
	50	433
Dig.	100	1.000
	50	1.067

A pesar de que el fango del espesador secundario ha permitido un mayor crecimiento de la población de nematodos se ha planteado la hipótesis de que el fango de recirculación biológica puede tener un elevado potencial como alimento para el nematodo que, sin embargo, está limitado por una menor concentración de materia orgánica por litro. Por tanto, se decidió realizar ensayos específicos decantando el fango de recirculación biológica (los resultados se muestran en la tabla IV.5).

Tabla IV. 5. Efecto de la concentración inicial de sustrato en el crecimiento máximo de la población de nematodos obtenido en matraces en orbital rotatorio; mediante dilución del fango del espesador secundario y decantación del fango de recirculación biológica.

Fecha del fango	Tipo de fango	[Fango] (% v/v)	Decantado (v/v)*	Tiempo de decantación (h)	Nematodos/ml	± DS
20-sep-11	Esp. 2°	100	-	-	45.200	-
		50	-	-	4.200	-
	Rec. bio.	100	-	-	966	-
		50	-	-	433	-
30-nov-11	Esp. 2°	100	-	-	21.066	666
		50	-	-	31.050	2.050
	Rec. bio.	100	-	-	1.133	-
	Rec. bio.	-	40/800	7	29.666	6.334
	Rec. bio.	-	20/200	7	24.800	-
	Rec. bio.	-	40/200	168	39.346	146
04-jun-12	Esp. 2°	100	-	-	146.666	29.334
		50	-	-	131.100	100
	Rec. bio.	-	250/1.000	216	71.516	4.616

*Volumen decantado/volumen total inicial

IV.1.3. Caracterización del fango del espesador secundario

El fango del espesador secundario ha mostrado un mayor rendimiento para el cultivo del nematodo *C. elegans*, por lo tanto, se ha realizado una caracterización completa para los fangos recogidos y utilizados durante este trabajo experimental para diferentes fechas del año (Tabla IV.6).

Tabla IV. 6. Variación de la composición físico-química del fango del espesador secundario durante varios años: fecha del fango, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), sólidos no volátiles (SNV), Demanda Química de Oxígeno (DQO), pH, conductividad eléctrica (CE), densidad (ρ), carbono orgánico total (COT), carbono total (CT), carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT), materia grasa y edad del fango.

Fecha del fango	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	pH	CE (mS/cm)	ρ (g/ml)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	Materia grasa (% p/p)	Edad del fango (días)
20-sep-11	2,24	-	-	-	-	-	1,01	-	-	-	-	-	-
13-oct-11	2,27	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-
08-nov-11	2,41	-	-	-	-	-	1,01	-	-	-	-	-	-
30-nov-11	1,69	1,30	0,390	-	-	-	1,01	-	-	-	-	-	-
20-dic-11	2,78	2,20	0,588	-	6,33	4,64	1,02	-	-	-	-	-	-
13-mar-12	2,49	1,92	0,563	-	6,53	3,74	-	-	-	-	-	-	-
11-abr-12	2,41	2,03	0,382	-	6,38	3,21	-	-	-	-	-	-	-
4-jun-12	2,69	2,23	0,466	-	6,48	3,03	-	-	-	-	-	-	-
24-jul-12	2,62	2,15	0,469	-	6,07	4,11	-	-	-	-	-	-	-
25-sep-12	2,71	2,22	0,485	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-feb-13	2,11	1,74	0,372	-	6,31	2,37	-	-	-	-	-	-	-
15-oct-14	3,38	2,58	0,807	30,8	6,30	1,61	1,01	9.970 (511)*	10.403 (597)*	434 (87)*	2.351 (181)*	0,993	3,20
12-ene-15	3,12	2,56	0,566	38,1	6,62	1,73	1,02	14.407 (1.350)*	15.132 (1.471)*	725 (122)*	3.309 (534)*	2,36	4,00
11-mar-15	2,87	2,35	0,521	38,7	6,01	1,63	1,01	5.681 (495)*	6.441 (669)*	760 (174)*	2.297 (365)*	1,67	2,40
13-may-15	2,92	2,36	0,563	40,5	6,24	1,65	1,00	6.493 (1.363)*	7.252 (1.503)*	759 (140)*	2.354 (780)*	0,672	2,70
27-may-15	3,27	2,67	0,603	45,0	6,50	1,74	1,01	6.727 (265)*	7.523 (401)*	797 (137)*	2.345 (180)*	-	2,10
12-jun-15	3,17	2,54	0,627	42,0	6,12	1,84	1,01	5.755 (584)*	6.393 (718)*	638 (134)*	1.908 (316)*	0,726	2,30
15-oct-15	3,22	2,49	0,730	-	6,88	-	-	-	-	-	-	-	-
Promedio	2,69	2,22	0,542	39,2	6,37	2,61	1,01	8.172 (761)*	8.858 (893)*	685 (132)*	2.427 (393)*	1,29	2,78
± DS	±0,363	±0,266	±0,0947	±3,34	±0,183	±0,949	±0,00453	±2.678 (±397)*	±2.607 (±396)*	±100 (±18,6)*	±294 (±176)*	±0,587	±0,544

*Valor en la fase líquida (sobrenadante obtenido mediante centrifugación del efluente global).

IV.2. Estudio de viabilidad del crecimiento de nematodos en fango de EDAR

Para estudiar el crecimiento de *C. elegans* en fango del espesador secundario procedente de la EDAR, se han realizado cultivos en medio sólido (placa de Petri) y medio líquido (matraces Erlenmeyer y biorreactores).

IV.2.1. Cultivos en medio sólido

IV.2.1.1. Crecimiento de *C. elegans* en fango de EDAR

El cultivo del nematodo en medio sólido se realiza en placas de agar con fango del espesador secundario extendido. Para cuantificar el crecimiento de la población de *C. elegans*, se realiza el conteo del número de individuos cuando el cultivo está saturado; lo cual queda recogido para fangos de diferentes fechas en la tabla IV.7.

Tabla IV. 7. Crecimiento máximo de la población de nematodos registrado tras cinco días de cultivo en fango del espesador secundario de diferentes fechas. Ensayos realizados en placa de Petri para diferentes concentraciones iniciales.

Fecha del fango	[Fango] (% v/v)	Nematodos/placa	± DS
20-sep-11	100	172.275	23.475
	50	166.199	39.600
	10	72.300	9.300
13-oct-11	100	58.324	4.200
	50	41.067	2.333
8-nov-11	100	60.300	900
	80	57.672	3.078
	50	42.714	20.880
30-nov-11	100	67.730	7.070
	80	69.600	800
	50	50.700	10.200
20-dic-11	100	96.750	2.250
	80	53.031	11.031
	50	22.367	2.167
13-mar-12	100	45.905	6.296
	50	25.286	1.871
11-abr-12	100	101.734	15.866
	50	60.000	3.000
4-jun-12	100	86.400	18.408
	50	62.300	700
24-jul-12	100	90.402	14.310
	50	69.962	25.809

IV.2.1.2. Número de nematodos-peso seco

La relación entre el número de nematodos y su peso seco permite determinar el porcentaje de materia orgánica del fango que se convierte en biomasa de nematodo. Por tanto, se ha determinado cuántos nematodos equivalen a 1 mg de peso seco para poder calcular el porcentaje de conversión de materia orgánica mediante extrapolación a partir del conteo del número de individuos en el cultivo (Tabla IV. 8).

Tabla IV. 8. Relación número de nematodos-peso seco para diferentes estadios poblacionales predominantes.

Fuente de carbono	Medio de cultivo	Proporción de cada estadio poblacional (%)				Número de nematodos	Peso seco (mg)	Nº de nematodos /1mg
		L1 y L2	Dauers	L3 y L4	Adultos			
Fango	Sólido	90%	5%	4%	1%	1.664.000	69,7	23.874
<i>E. coli</i>	Líquido	90%	5%	4%	1%	660.960	20,7	31.930
<i>E. coli</i>	Líquido	85%	5%	5%	5%	3.316.800	183	18.115
<i>E. coli</i>	Líquido	85%	5%	5%	5%	2.300.000	147	15.625
<i>E. coli</i>	Líquido	83%	5%	5%	7%	1.900.000	212	8.971
<i>E. coli</i>	Líquido	80%	5%	5%	10%	346.800	51,0	6.800

IV.2.1.3. Número de nematodos en función de peso seco, materia orgánica, carbono total, carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

El cálculo indirecto del porcentaje de conversión de materia orgánica a partir de la equivalencia entre el número de nematodos y su peso seco, tiene menor fiabilidad cuando el cultivo no está saturado. Por tanto, se planteó la posibilidad de establecer también una relación con la medida de carbono total mediante análisis en el TOC que podría permitir un seguimiento directo del cultivo independientemente de los estadios poblacionales predominantes. Además, la cantidad de muestra necesaria es mucho menor que para la determinación del peso seco. Por tanto, se realizó una recta de calibrado para comprobar la fiabilidad de este método a partir de una muestra de peso seco conocido (6.800 nematodos/mg) (Tabla IV.9).

Tabla IV. 9. Número de nematodos, peso seco, carbono orgánico total (COT), carbono total (CT), carbono inorgánico (CI) y nitrógeno total (NT). Rango de 100-100.000 nematodos.

Número de nematodos	Peso seco de nematodos* (mg)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
100	0,0147	0,570 ±0,100	1,35 ±0,210	0,780 ±0,110	0,170 ±0,010
200	0,0294	0,705 ±0,0350	1,50 ±0,015	0,790 ±0,050	0,175 ±0,025
1.000	0,147	1,695 ±0,0250	2,78 ±0,100	1,09 ±0,075	0,510 ±0,000
2.000	0,294	3,49 ±0,190	4,99 ±0,385	1,50 ±0,195	1,14 ±0,050
5.000	0,735	8,92 ±0,415	11,2 ±0,315	2,29 ±0,100	3,23 ±0,185
10.380	1,53	24,5 ±0,730	28,5 ±0,500	3,98 ±0,230	9,72 ±0,185
20.760	3,05	46,6 ±2,075	51,3 ±2,02	4,71 ±0,060	18,8 ±0,965
31.140	4,58	83,7 ±1,88	88,6 ±1,75	4,90 ±0,125	34,7 ±0,940
40.800	6,00	144 ±0	149 ±0	5,20 ±0	70,1 ±0
51.900	7,63	148 ±2,88	153 ±2,81	5,48 ±0,065	61,2 ±2,66
81.600	12,0	292 ±11,2	299 ±11,1	6,92 ±0,165	144 ±4,29
102.000	15,0	330 ±32,3	340 ±31,8	9,21 ±0,500	178 ±12,2

*Valores calculados a partir de una muestra mayor de peso seco conocido (346.000 nematodos = 51 mg)

IV.2.2. Cultivo en matraces en orbital rotatorio

Para el desarrollo de los cultivos de nematodo se han utilizado matraces de 100 ml con un volumen de medio de cultivo de 20 ml; realizándose el seguimiento mediante observación y conteo en lupa hasta obtener el máximo poblacional.

IV.2.2.1. Efecto de la variación del fango recogido de la EDAR en diferentes fechas en el crecimiento del nematodo

El crecimiento poblacional de *C. elegans* varía a partir de fangos de diferentes fechas, registrados durante varios años; lo cual se recoge en la tabla IV.10.

Tabla IV. 10. Crecimiento máximo de la población de nematodos a partir de fango del espesador secundario obtenido en matraces en orbital rotatorio para fangos de diferentes fechas y concentraciones.

Fecha del fango	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml	± DS
20-sep-11	100	45.200	-
	50	4.200	-
	20	667	-
	10	367	-
13-oct-11	100	20.050	1.550
	50	1.567	283
8-nov-11	100	17.466	1.334
	75	15.533	2.733
	50	6.799	1.333
	25	2.100	150
30-nov-11	100	16.000	1.333
20-dic-11	100	69.866	934
	80	63.334	5.066
	50	91.300	3.500
13-mar-12	100	79.532	15.800
	80	94.800	4.400
	50	45.500	1.100
11-abr-12	100	146.850	10.750
	50	34.200	3.800
4-jun-12	100	198.266	15.066
	50	117.450	8.250
24-jul-12	100	230.466	16.334
	50	118.816	7.716
25-sep-12	100	88.490	4.810
	50	40.084	1.416
04-feb-13	100	96.800	7.332
	50	44.800	1.600

Continuación Tabla IV. 10.

Fecha del fango	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml	± DS
15-oct-14	100	15.468	800
	50	35.666	6.334
	25	34.134	934
12-ene-15	100	191.940	21.540
	50	120.880	9.400
	25	55.660	4.060
11-mar-15	100	103.400	7.680
	50	80.340	4.060
	25	31.480	-
13-may-15	100	71.100	20
	50	58.540	7.460
	25	20.420	3.300
27-may-15	100	67.334	1.066
	50	77.800	68
	25	29.466	2.266
12-jun-15	100	117.134	12.066
	50	69.000	3.268
	25	25.800	1.400

IV.2.2.2. Influencia de la concentración inicial de fango

La concentración inicial de sustrato es un parámetro influyente en cualquier medio de cultivo. Por tanto, se estudió el efecto de diferentes concentraciones iniciales de fango en el crecimiento poblacional del nematodo: 100, 75, 60, 50, 35 y 25% (v/v). Los resultados se muestran en la tabla IV.11.

Tabla IV. 11. Influencia de la concentración inicial de fango en el crecimiento poblacional de nematodos obtenido en matraces en orbital rotatorio. Fango del espesador secundario de 15-octubre-2014.

t (h)	[Fango] _{inicial} (% v/v)					
	Nematodos/ml ± DS					
	100%	75%	60%	50%	35%	25%
0	-	-	-	-	-	-
24	1.342 ±125	1.850 ±50	1.808 ±8	1.650 ±334	2.075 ±259	1.900 ±184
47	3.556 ±378	2.210 ±60	8.700 ±234	7.489 ±1.867	11.067 ±1.667	9.900 ±300
56	-	-	10.633 ±33	-	13.100 ±1.234	-
73	3.245 ±67	5.697 ±837	15.830 ±1.030	9.378 ±2.978	23.666 ±334	10.667 ±245
87	7.338 ±1.163	-	-	18.500 ±3.300	-	19.767 ±967
96	7.233 ±433	14.600 ±1.120	46.740 ±8.740	24.444 ±3.424	40.260 ±3.580	29.400 ±600
100	-	10.000 ±800	-	-	-	-
112	15.468 ±800	-	-	32.866 ±3.534	-	31.266 ±1.534
120	9.800 ±1.132	14.520 ±520	63.460 ±3.460	34.250 ±7.750	49.460 ±3.620	29.200 ±800
126	-	11.060 ±140	-	-	-	-
135	8.860 ±740	-	-	22.266 ±5.066	-	31.134 ±3.934
144	8.332 ±1.400	-	48.320 ±13.800	20.400 ±4.132	28.800 ±2.400	29.800 ±3.400
152	-	14.120 ±1.600	-	-	-	-
165	3.600 ±0	17.460 ±2.260	27.460 ±2.140	7.932 ±1.400	-	16.468 ±1.000
183	4.350 ±1.150	-	-	10.268 ±2.400	-	3.750 ±250
207	1.567 ±367	-	-	2.300 ±234	-	3.800 ±534
240	-	11.606 ±126	6.095 ±965	-	4.800 ±330	-
335	-	5.700 ±1.100	-	-	-	-

IV.2.2.3. Efecto del almacenamiento del fango

El fango tras ser recogido de la EDAR de referencia, es almacenado a una temperatura de 4°C para minimizar la actividad biológica que pueda modificar sus propiedades. Sin embargo, se ha observado que el tiempo de almacenamiento modifica la capacidad del fango de alimentar al nematodo *C. elegans* como se recoge en la tabla IV.12.

Tabla IV. 12. Influencia del tiempo de almacenamiento del fango del espesador secundario en el máximo crecimiento poblacional de nematodos registrado en matraces en orbital rotatorio.

Fecha del fango	Tiempo de almacenamiento a 4°C (días)	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml	± DS
30-nov-11	1	100	16.000	1.333
	41	100	79.333	3.333
	50	100	47.066	5.466
		50	8.667	2.800
	70	100	59.000	1.668
		50	30.150	3.450
	110	100	52.900	1.300
	159	100	21.066	666
		50	31.050	2.050
11-abr-12	2	100	146.850	10.750
		50	34.200	3.800
	37	100	195.934	7.666
		50	104.116	6.816
	51	50	59.234	3.366

IV.2.2.4. Influencia del inóculo inicial

El estudio de la influencia del inóculo se ha llevado a cabo realizando experimentos con diferente número inicial de nematodos por ml (Tabla IV.13). Previamente se había observado que el fango agitado y aireado antes de la inoculación de *C. elegans* influía negativamente en el crecimiento final de la población de nematodos frente a una inoculación directa (Tabla IV.14). La hipótesis planteada es que durante este periodo de agitación y aireación se puede estar simulando una digestión aerobia por parte de los microorganismos presentes en el fango que pudiera disminuir la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y del nematodo.

Tabla IV. 13. Efecto del inóculo inicial en el crecimiento máximo poblacional de nematodos a partir de fango del espesador secundario obtenido en matraces en orbital rotatorio.

Fecha del fango	Tiempo de almacenamiento a 4°C (días)	Inóculo inicial (Nematodos/ml)	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml	± DS
30-nov-11	70	100	100	59.000	1.668
		100	50	30.150	3.450
		1.000	100	156.900	2.600
30-nov-11	110	100	100	52.900	1.300
		500	100	75.000	1.268
		1.000	100	71.266	4.334
		1.000	50	51.000	3.800
		1.500	100	67.750	550

Tabla IV. 14. Influencia del momento de inoculación determinando el máximo crecimiento poblacional de nematodos a partir de fango del espesador secundario obtenido en matraces en orbital rotatorio para dos situaciones de inoculación: directa (A) y después de varios días de agitación y aireación en matraz (B) o reactor (C).

Fecha del fango	Condición de inoculación	[Fango] (% v/v)	Nematodos/ml	± DS
20-dic-11	(A) Directa	100	80.399	5.867
	(B) Después de 7 días de agitación y aireación en matraz	100	1.500	0
13-mar-12	(A) Directa	100	79.532	15.800
	(A) Directa	80	94.800	4.400
	(A) Directa	50	45.500	1.100
	(C) Después de 5 días de agitación y aireación en biorreactor	80	1.250	450

IV.2.2.5. Efecto de los antiespumantes

Con el objetivo de reducir la formación de espumas generadas en los biorreactores, se ha optado por la utilización de antiespumantes químicos. En la tabla IV.15 se muestran los datos obtenidos para los antiespumantes estudiados en cuanto a toxicidad (crecimiento de la población de nematodos en matraces) y efectividad (eliminación de la espuma en biorreactores).

Tabla IV. 15. Efecto de los diferentes antiespumantes en el máximo crecimiento poblacional de nematodos a partir de fango del espesador secundario al 50% (v/v) obtenido en matraces en orbital rotatorio.

Fecha del fango	Antiespumante	Nematodos/ml	± DS	Efectividad en reactor
11-abr-12	Sin antiespumante	59.234	3.366	-
	A concentrado	73.534	12.866	NO
	A*	63.800	868	NO
	204	14.466	866	SI
4-jun-12	Sin antiespumante	69.600	4.268	-
	AFC 5610	69.134	4.866	SI
	Evescol	72.400	4.400	NO

*Antiespumante A diluido en propilenglicol (1:8 v/v).

IV.2.2.6. Reducción de fango

Uno de los principales objetivos de este proyecto de investigación, es disminuir el fango generado en las EDARs. Por tanto, se ha estudiado la reducción de sólidos de manera detallada en biorreactores. Además, para tener una aproximación inicial, se determinó la eliminación de sólidos totales (ST) en matraces en orbital rotatorio con presencia y ausencia del nematodo (Tabla IV.16).

Tabla IV. 16. Reducción de los sólidos totales del fango del espesador secundario al 50% (v/v) con presencia o ausencia de nematodos en un cultivo en matraces en orbital rotatorio durante 5 días. Fango fecha del 4-junio-12.

Inóculo de nematodos	Nematodos/ml	± DS	Reducción de fango (% de ST)	± DS
SI	107.667	1.667	10,8	0,143
NO	-	-	8,30	0,0937

IV.2.2.7. Efecto de la adición de nutrientes de enriquecimiento

Para el cultivo del nematodo *C. elegans* en laboratorio se utiliza un medio estándar (S-Medio) cuya fuente de carbono es aportada por la bacteria *E. coli*. Además, se adicionan siete componentes: NaCl, KH₂PO₄, colesterol, citrato potásico, trazas de metales, MgSO₄ y CaCl₂. Por su parte, en los cultivos con fango, éste sustituye a *E. coli* como fuente de carbono; por tanto, se han realizado ensayos con y sin adición de los siete componentes para determinar su posible influencia en el crecimiento poblacional del nematodo (Tabla IV.17).

Tabla IV. 17. Crecimiento máximo poblacional de *C. elegans* en fango del espesador secundario de diferentes fechas con o sin adición de los 7 componentes del S-Medio. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio.

Fecha del fango	[Fango] (% v/v)	Adición de los 7 componentes	Nematodos/ml	± DS
13-oct-11	100	SI	20.050	1.550
	100	NO	170	50
8-nov-11	100	SI	17.466	1.334
	100	NO	14.800	1.400
30-nov-11	100	SI	47.066	5.466
	100	NO	44.133	3.067
20-dic-11	100	SI	69.866	934
	100	NO	49.733	4.267
11-abr-12	100	SI	146.850	10.750
	100	NO	70.134	7.734
	50	SI	34.200	3.800
	50	NO	20.000	-
4-jun-12	100	SI	198.266	15.066
	100	NO	81.200	-
24-jul-12	100	SI	230.466	16.334
	50	SI	118.816	7.716
	50	NO	16.800	3.200
25-sep-12	100	SI	88.490	4.810
	50	SI	40.084	1.416
	50	NO	783	150
15-oct-15	50	SI	64.033	3.441
	50	NO	25.333	1.131

Con el objetivo de reducir el uso de los nutrientes de enriquecimiento adicionados al medio de cultivo formado por fango del espesador secundario, se han realizado experimentos donde se elimina uno o varios componentes y se estudia su efecto hasta identificar los nutrientes más influyentes en el crecimiento de *C. elegans* como se observa en las tablas IV.18 y IV.19.

Tabla IV. 18. Influencia de la adición de los componentes del S-Medio al fango sobre el crecimiento poblacional de *C. elegans* respecto al tiempo: adicionando los 7 componentes, sin ningún componente, con todos los componentes excepto uno y adicionando solo un componente. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio con fango del espesador secundario 15-octubre-15 con una concentración del 50% v/v.

Nematodos/ml												
t (h)	Adición de los 7 componentes	Sin componentes	Adicionando todos los componentes excepto uno			t (h)	Adición de los 7 componentes	Sin componentes	Adicionando todos los componentes excepto uno			
			Sin NaCl	Sin colesterol	Sin KH ₂ PO ₄				Sin citrato	Sin metales	Sin CaCl ₂	Sin MgSO ₄
0	683	896	658	608	583	0	416	450	408	366	366	458
24	1.633	1.400	1.442	1.492	1.500	69	15.933	8.483	15.533	15.950	15.717	14.016
48	14.200	12.133	15.317	14.683	15.783	93	32.483	14.617	31.200	32.766	34.017	33.066
72	43.100	22.667	44.200	37.533	40.166	117	42.800	21.200	41.267	42.600	47.200	44.666
96	64.033	25.333	54.033	49.700	47.666	141	44.367	19.433	42.200	44.166	46.666	45.900
120	44.667	20.000	43.900	38.000	43.000	165	40.967	16.833	37.667	36.966	38.300	35.800

Nematodos/ml											
t (h)	Adición de los 7 componentes	Sin componentes	Adicionando solo un componente			Adición de los 7 componentes	Sin componentes	Adicionando solo un componente			
			NaCl	Colesterol	KH_2PO_4			Citrato	Metales	CaCl_2	MgSO_4
0	513	525	613	450	463	350	450	350	400	417	458
69	23.033	7.033	15.116	7.217	14.916	14.733	7.400	11.916	6.950	6.100	7.000
93	39.500	8.233	24.133	9.100	17.533	41.700	8.800	21.833	9.700	12.700	8.533
117	45.533	9.833	31.966	9.800	22.067	37.033	9.200	20.667	8.966	8.600	7.867
141	54.833	12.933	21.733	13.033	18.367	27.733	11.567	18.100	10.733	10.300	9.567
165	35.366	11.900	19.667	11.633	14.866	21.500	8.733	22.533	11.433	9.300	9.367

Tabla IV. 19. Crecimiento poblacional de *C. elegans* en fango del espesador secundario adicionando los 7 componentes del S-Medio, sin adición de ningún componente y con la adición de componentes de manera agrupada. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio con fango del espesador secundario 15-oct-15 con una concentración del 50% v/v.

Nematodos/ml						
Tiempo (h)	Adición de los 7 componentes	Sin componentes	Adicionando combinaciones de componentes			
			NaCl + Citrato + KH_2PO_4	NaCl + Citrato	NaCl + KH_2PO_4	Citrato + KH_2PO_4
0	600	493	688	625	588	688
69	31.867	16.933	34.866	31.733	29.499	29.667
93	49.567	16.200	43.500	36.100	42.933	39.767
117	46.666	18.666	49.800	42.900	44.500	37.533
141	47.767	18.166	48.566	41.866	45.733	40.400
165	46.800	18.566	47.900	41.524	45.067	44.433

IV.2.3. Cultivo en biorreactor tanque agitado

El cultivo de *C. elegans* a partir de fango en biorreactores constituye uno de los objetivos principales de este proyecto de investigación ya que para poder realizar el proceso a nivel industrial, las condiciones de cultivo deben ser escalables a los volúmenes de fango generados en las EDARs actuales. En consecuencia, el cultivo en biorreactores se ha estudiado desde dos perspectivas: la cinética de crecimiento del nematodo y la degradación del fango. Los resultados obtenidos se agrupan de la siguiente manera:

IV.2.3.1. Estudio de la viabilidad del nematodo en biorreactores

IV.2.3.2. Estudio de algunas condiciones de operación en biorreactores:

- A) Efecto de la concentración de sustrato
- B) Efecto del nivel de aireación
- C) Influencia de la agitación mecánica

IV.2.3.1. Estudio de la viabilidad del nematodo en biorreactores

En la tabla IV.20 se muestran las condiciones de cultivo ensayadas en biorreactores modificando parámetros como la velocidad y tipo de agitación, el caudal de aireación, la concentración de fango, el inóculo inicial o el efecto de antiespumantes. Estos resultados experimentales han permitido obtener unas condiciones de cultivo iniciales de viabilidad del nematodo en biorreactores de 1 L a partir de fango del espesador secundario.

Tabla IV. 20. Viabilidad del crecimiento de la población de *C. elegans* en biorreactores de 1 L de volumen expresado como máximo número de nematodos/ml. En cada experimento se recogen las principales condiciones: inóculo inicial, fecha del fango, concentración del fango, caudal de aireación, velocidad de agitación, agitador magnético (M), aspas Rushton (R), aspas de Hélice (H) o aspas tipo “U” (U), crecimiento máximo de la población de nematodos, antiespumante utilizado (químico o aspas superficiales de PVC) y porcentaje de materia orgánica de fango convertida en nematodo (% conversión de M.O.).

Inóculo inicial	Fecha Fango	[Fango] (% v/v)	Aireación (L/min)	Agitación (rpm)	Nem/ml	Antiespumante	Conversión de M.O (%)	
100 Nem/ml	13-oct-11	100	Máxima	600 (M)	-	-	0	
	08-nov-11	75	2	700 (M)	690	-	0,50	
		50	2	700 (M)	3.500	-	2,40	
		25	2	700 (M)	393	-	0,30	
	30-nov-11	80	2	170 (R)	5.000	-	1,90	
		80	0	130 (R)	110	A	0,04	
		40	2	500 (M)	130	A	0,10	
		20	2	500 (M)	190	A	0,30	
	20-dic-11	100	2	170 (R)	10.700	-	1,90	
		80	2	500 (M)	750	-	0,20	
		80	1	500 (M)	2.100	-	0,50	
		50	2	0	6.275	-	2,20	
	500 Nem/ml	13-mar-12	100	2	170 (R)	15.500	-	3,70
			50	2	0	78.000	A*	36,9
11-abr-12		50	2	0	3.734	204	1,70	
		50	2	0	1.100	204	0,50	
		50	1	170 (R)	5.534	204	2,50	
		50	3	240 (H)	5.550	204	2,50	
		50	2	600 (H)	20.400	A*	9,40	
04-jun-12		50	2	0	48.668	A*	20,4	
		50	2	600 (H)	69.267	A*	29,1	
		50	1	900 (H)	88.700	A*	37,3	
24-jul-12		50	2	0	42.600	AFC 5610	18,7	
		50	2	600 (H)	59.900	Aspas PVC	26,1	
25-sep-12		50	2	600 (H)	34.400	Aspas PVC	14,3	
04-feb-13		50	2	260 (U)	73.400	Aspas PVC	39,2	

*Antiespumante A diluido en propilenglicol (1:8 v/v).

IV.2.3.2. Estudio de algunas condiciones de operación en biorreactores

Una vez establecido el fango a utilizar y unas condiciones que permiten la viabilidad de la población de nematodos, se han desarrollado tres series experimentales en biorreactores manteniendo todos los parámetros de operación constantes excepto uno y así estudiar su influencia en la cinética poblacional del nematodo y la degradación del fango:

A) Efecto de la concentración de sustrato

B) Efecto del nivel de aireación

C) Influencia de la agitación mecánica

A continuación, se recogen de manera independiente los datos de cada experimento en biorreactores, agrupados dentro de cada una de las tres series. Para cada experimento se ha determinado respecto al tiempo: número de nematodos por ml, pH, conductividad, carbono total (CT), carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT), nitrógeno Kjeldahl total (NKT) y nitratos y nitritos (NN). Estas medidas se han realizado tanto en el efluente global (fango, nematodos y agua) como en la fase líquida (sobrenadante resultante tras centrifugación); a su vez, las mediadas de biomasa se obtienen por diferencia entre los valores en el efluente global y la fase líquida. Paralelamente, para tiempo final e inicial se han determinado los valores de DQO, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos no volátiles (SNV).

A) Efecto de la concentración de sustrato

En esta serie experimental, se ha analizado el efecto de la concentración inicial de fango (25, 35, 50, 60 y 75% v/v) sobre el crecimiento de *C. elegans*. Por tanto, se han mantenido constantes los parámetros de temperatura (20°C), caudal de aireación (2 L/min) y velocidad de agitación mecánica con aspas de tipo “U” (260 rpm).

Las tablas IV.21, IV.25, IV.29, IV.33, IV.37 y IV.41 recogen el crecimiento de la población de nematodos y las medidas del pH y la conductividad con respecto al tiempo.

Por su parte, en las figuras IV.1-IV.6 se representan el crecimiento de la población de nematodos y las fluctuaciones del carbono total de la biomasa (fango + nematodos) a lo largo del experimento.

En cada experimento se ha llevado a cabo un seguimiento diario de los valores del carbono y nitrógeno tanto en el efluente global como en el agua tratada que se muestran en las tablas IV.23, IV.24, IV.27, IV.28, IV.31, IV.32, IV.35, IV.36, IV.39, IV.40, IV.43 y IV.44.

A su vez, se han determinado a tiempo inicial y final los sólidos totales, la materia orgánica, las cenizas, la demanda química de oxígeno y la materia grasa (tablas IV.22, IV.26, IV.30, IV.34, IV.38 y IV.42).

Tabla IV. 21

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DEL FANGO (SIN NEMATODO)

Experimento: B1 Fango de 15-oct-2014 Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

T: 20 (°C) pH: sin control Q: 2 (L/min) Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)
0	6,08	15,7
21	6,83	15,7
32	6,93	15,8
45	6,85	16,0
52	7,12	16,0
57	7,04	16,0
67	6,69	16,2
73	6,88	16,4
79	6,93	16,4
92	6,93	16,8
96	7,05	16,9
102	7,03	16,9
115	6,85	17,1
123	7,13	17,2

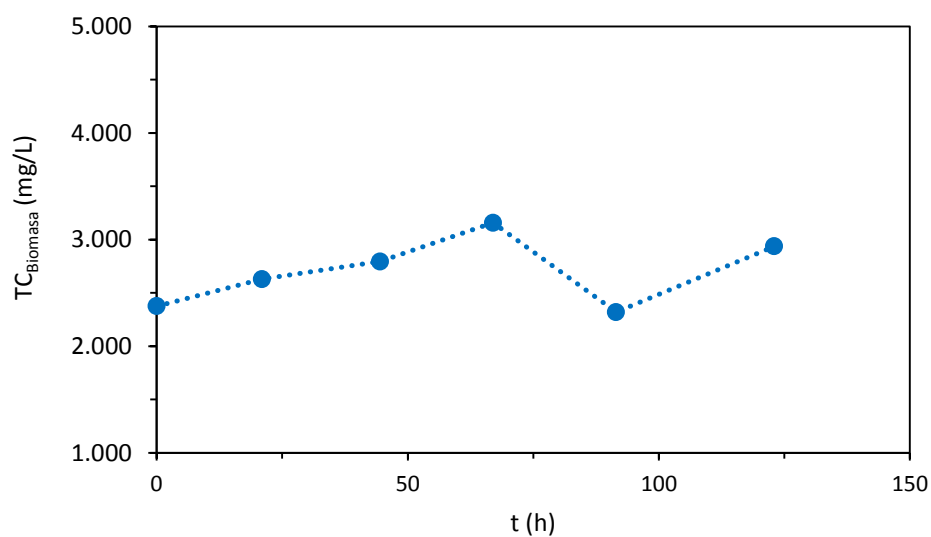
**Figura IV. 1.** Crecimiento de la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 22

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,15	0,738	1,41	12,0	-
Final = 123	2,24	0,705	1,54	11,3	3,60

Tabla IV. 23

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	3.765	3.863	97	622
21	3.409	3.566	157	682
45	3.520	3.686	166	709
67	3.497	3.665	168	692
92	3.171	3.358	187	655
123	3.402	3.594	192	697

Tabla IV. 24

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	1.476	1.487	10	199	-
21	912	936	24	231	-
45	876	891	15	214	-
67	493	508	15	124	-
92	1.017	1.038	21	265	8,18
123	638	657	19	161	6,44

Tabla IV. 25

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B2 Fango de 15-oct-2014 Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

T: 20 (°C) pH: sin control Q: 2 (L/min) Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,03	14,9	500
20	6,67	16,0	2.933
31	6,80	15,8	2.375
44	7,24	16,0	3.400
53	7,24	16,4	13.400
67	7,03	16,6	37.800
72	7,12	16,6	43.000
77	7,08	16,7	48.600
91	7,42	17,0	32.000
101	7,35	17,0	11.467
115	7,10	17,6	3.233
122	7,26	17,7	6.567
139	7,15	17,6	4.583

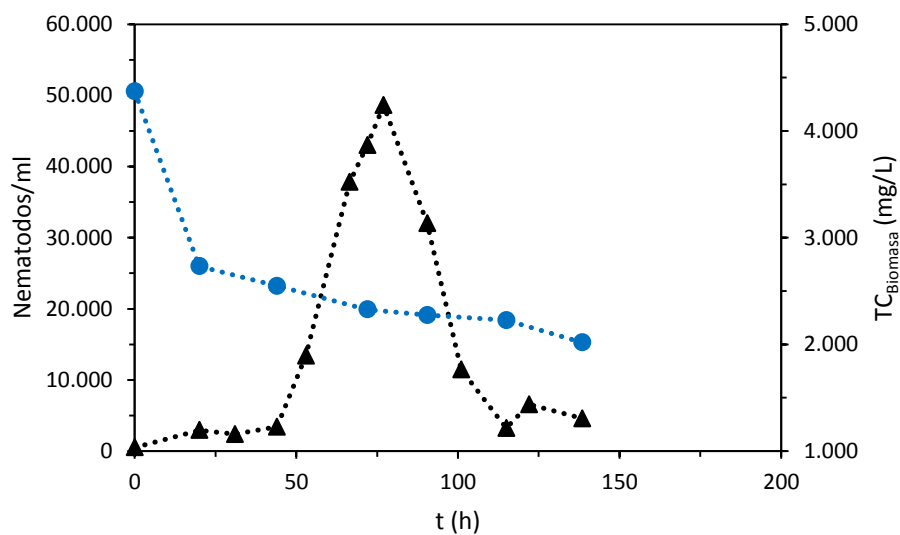


Figura IV. 2. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 26

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,24	0,789	1,45	8,7	-
Final = 139	2,14	0,595	1,54	9,9	1,55

Tabla IV. 27

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	2.039	2.251	212	484	-
20	2.687	2.913	226	727	-
44	2.455	2.693	239	741	-
72	2.252	2.488	236	719	10,3
91	2.213	2.441	228	722	17,4
115	2.203	2.420	218	726	29,4
139	2.022	2.222	201	669	57,8

Tabla IV. 28

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	531	535	4	160	0,249
20	171	181	10	86	0,172
44	140	146	6	82	4,24
72	155	161	6	161	12,1
91	161	166	5	180	17,2
115	188	194	5	244	31,0
139	202	205	3	-	-

Tabla IV. 29

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B3

Fango de 15-oct-2014

Medio de cultivo: 35% Fango (v/v)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 2 (L/min)

Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	5,87	16,5	500
21	6,44	16,6	2.392
30	6,79	16,6	3.400
45	6,86	16,8	10.100
54	6,78	16,9	10.883
67	6,82	17,3	13.033
73	6,80	17,4	14.067
78	7,00	17,4	24.400
91	6,92	17,8	42.400
96	6,89	17,9	31.200
102	6,95	17,9	30.067
116	6,89	18,3	33.000
123	6,82	18,1	32.733
140	6,82	18,5	27.733
146	6,62	18,4	30.200
150	6,58	18,4	26.000
164	6,39	18,6	19.400
168	6,39	18,6	17.733

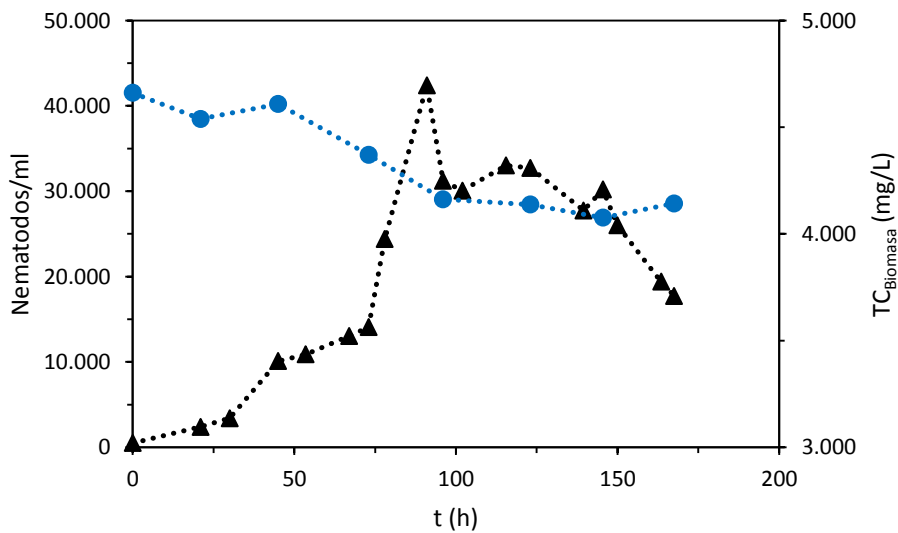


Figura IV. 3. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 30

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,56	0,991	1,56	21,4	-
Final = 168	2,62	0,889	1,73	16,9	1,64

Tabla IV. 31

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	5.993	6.462	469	859	-
21	5.024	5.532	509	873	-
45	5.131	5.619	488	878	-
73	4.882	5.337	456	878	-
96	4.846	5.274	428	877	-
123	4.959	5.329	370	900	-
146	4.928	5.283	354	903	51,5
168	5.038	5.351	313	922	97,8

Tabla IV. 32

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	1.783	1.801	17	202	-
21	951	994	-	209	-
45	987	1.011	24	215	6,40
73	935	967	33	220	11,3
96	1.077	1.112	35	265	18,8
123	1.155	1.192	36	299	36,9
146	1.172	1.207	35	323	71,3
168	1.176	1.208	32	336	106,6

Tabla IV. 33

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B4 Fango de 15-oct-2014 Medio de cultivo: 50% Fango (v/v)

T: 20 (°C) pH: sin control Q: 2 (L/min) Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,19	15,9	500
20	6,81	15,5	1.550
26	6,93	15,5	1.944
42	6,96	15,7	5.578
47	6,93	16,0	6.411
52	7,34	16,1	10.422
66	7,45	16,7	25.200
71	7,41	16,5	33.733
77	7,43	16,8	34.400
91	7,38	17,0	56.500
95	7,45	17,1	58.933
99	7,01	17,3	60.467
115	6,68	17,6	28.400
125	6,80	17,6	15.333
143	6,53	17,7	9.333
162	6,46	18,0	7.600
168	6,36	17,9	6.100
186	6,29	18,3	6.633

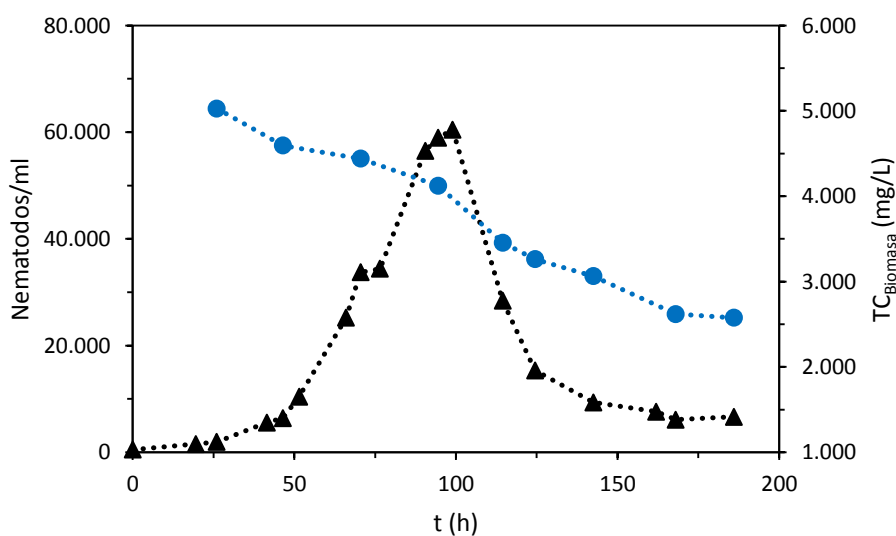


Figura IV. 4. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 34

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	-	-	-	-	-
Final = 186	2,83	1,03	1,81	2,83	-

Tabla IV. 35

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANSURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	-	-	-	-	-
26	5.166	5.476	311	1.200	-
47	4.921	5.124	203	-	-
71	-	-	-	-	-
95	4.530	4.630	100	1.333	74,4
115	3.627	3.707	80	1.131	123
125	3.687	3.765	78	1.164	161
143	3.512	3.582	69	1.138	203
168	3.042	3.105	63	1.043	247
186	2.958	3.018	59	1.053	266

Tabla IV. 36

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANSURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	-	-	-	-	-
26	228	266	39	81	6,11
47	427	449		98	13,5
71	502	531	28	173	-
95	519	520	-	191	-
115	506	507	-	290	-
125	-	-	-	-	155
143	493	503	10	361	226
168	511	519	8	424	256
186	480	487	7	429	265

Tabla IV. 37

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B5 Fango de 15-oct-2014 Medio de cultivo: 60% Fango (v/v)

T: 20 (°C) pH: sin control Q: 2 (L/min) Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	5,91	16,5	500
21	6,85	16,6	2.383
30	6,83	16,5	3.192
45	6,86	16,8	9.217
54	6,88	16,9	11.683
67	6,97	17,2	17.667
73	7,07	17,3	28.467
78	7,09	17,2	44.600
91	6,88	17,6	63.300
96	6,91	17,6	45.800
102	6,82	17,7	48.333
116	6,75	18,0	22.333
123	6,57	18,0	19.667
140	6,41	18,2	13.933
146	6,39	18,4	15.657
150	6,35	18,5	17.067
164	6,25	18,5	16.467
168	6,24	18,5	16.400

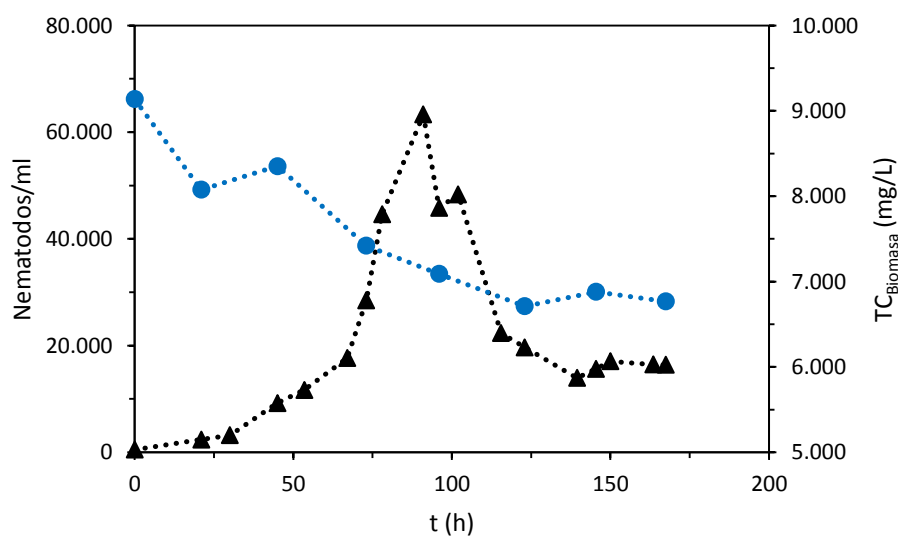


Figura IV. 5. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 38

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	3,18	1,31	1,87	32,7	-
Final = 168	3,27	1,54	1,73	26,7	1,36

Tabla IV. 39

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	10.753	11.252	499	1.636	-
21	8.898	9.505	606	1.545	-
45	9.158	9.766	608	1.584	-
73	8.151	8.736	585	1.559	-
96	7.834	8.368	534	1.537	36,7
123	7.704	8.167	463	1.528	93,0
146	7.832	8.227	395	1.597	172
168	7.957	8.307	350	1.619	229

Tabla IV. 40

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	2.101	2.115	13	308	-
21	1.406	1.429	23	355	-
45	1.395	1.415	20	357	11,9
73	1.296	1.316	20	392	27,3
96	1.261	1.279	17	424	57,9
123	1.440	1.456	16	497	114
146	1.336	1.349	13	512	179
168	1.526	1.539	13	594	243

Tabla IV. 41

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B6 Fango de 15-oct-2014 Medio de cultivo: 75% Fango (v/v)

T: 20 (°C) pH: sin control Q: 2 (L/min) Agitación: 260 (rpm)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,06	15,8	500
20	6,73	15,3	1.300
31	6,77	14,5	1.825
44	7,19	15,5	2.883
53	7,25	15,5	3.500
67	7,09	15,6	8.733
72	6,92	15,6	12.333
77	6,95	15,6	11.600
91	6,72	15,7	8.629
101	6,67	15,6	2.333
115	6,55	16,3	867
122	6,47	15,7	1.842
139	6,43	16,4	1.225
0	6,06	15,8	500
20	6,73	15,3	1.300
31	6,77	14,5	1.825
44	7,19	15,5	2.883

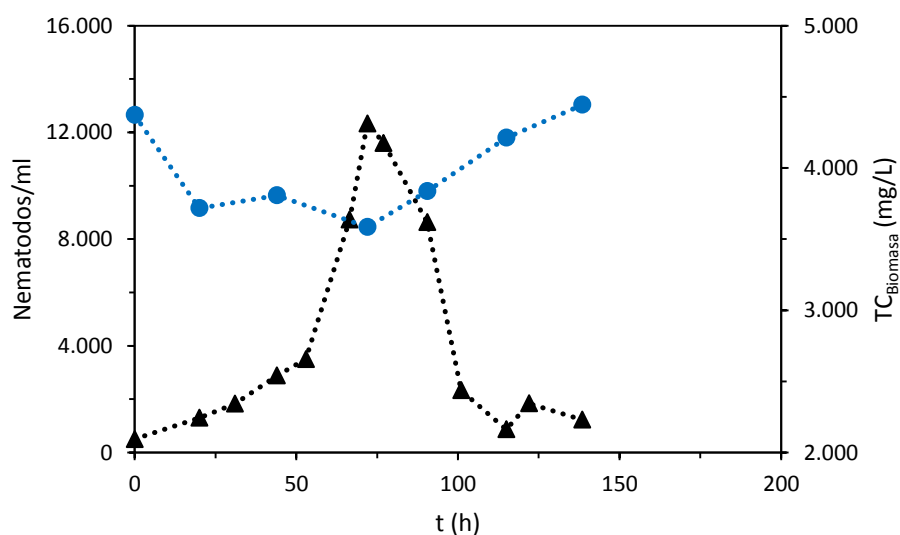


Figura IV. 6. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 42

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	3,68	1,92	1,76	30,9	-
Final = 139	3,40	1,57	1,83	10,4	0,424

Tabla IV. 43

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	4.475	4.780	305	2.354	-
20	3.846	4.153	307	2.118	-
44	3.879	4.187	307	2.104	-
72	3.645	3.972	327	2.097	19,4
91	3.892	4.250	358	2.100	59,6
115	4.339	4.674	334	1.857	148
139	4.611	4.916	305	1.885	205

Tabla IV. 44

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	986	993	7	256	-
20	430	436	6	257	-
44	372	379	-	276	-
72	381	387	6	338	17,7
91	409	413	4	394	66,2
115	458	461	3	480	141
139	469	471	2	528	199

B) Efecto del nivel de aireación

Para estudiar el efecto de la aireación sobre el crecimiento de *C. elegans*, se ha modificado el caudal de aire en: 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 L/min. Los parámetros que se mantienen constantes en esta serie experimental han sido: temperatura (20°C), concentración inicial de fango (25% v/v) y velocidad de agitación mecánica con aspas de tipo "U" (260 rpm).

Las tablas IV.45, IV.49, IV.53, IV.57, IV.61 y IV.65 muestran el crecimiento de la población de nematodos, las medidas de pH y conductividad con respecto al tiempo.

En las figuras IV.7-IV.12 se representan el crecimiento de la población de nematodos y las fluctuaciones del carbono total de la biomasa (fango + nematodos) durante el experimento.

Para cada experimento se ha realizado un seguimiento diario de los valores del carbono y nitrógeno tanto en el efluente global como en el agua tratada (tablas IV.47, IV.48, IV.51, IV.52, IV.55, IV.56, IV.59, IV.60, IV.63, IV.64, IV.67 y IV.68). También se han determinado a tiempo inicial y final los sólidos totales, la materia orgánica, las cenizas, la demanda química de oxígeno y la materia grasa (tablas IV.46, IV.50, IV.54, IV.58, IV.62 y IV.66).

Tabla IV. 45

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B7 Fango de 12-ene-2015 Q: 0 (L/min)

T: 20 (°C) pH: sin control Agitación: 260 (rpm) Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	5,86	16,4	1.567
20	5,82	16,5	1.700
41	6,14	17,0	1.286
51	6,26	16,9	714
64	6,26	17,0	483
70	6,26	17,0	417
75	6,18	17,0	467
88	6,35	16,8	367
94	6,44	17,1	417
102	6,39	16,9	350
113	6,44	16,9	367
121	6,59	16,9	550
137	7,09	16,8	417
144	6,88	16,8	367

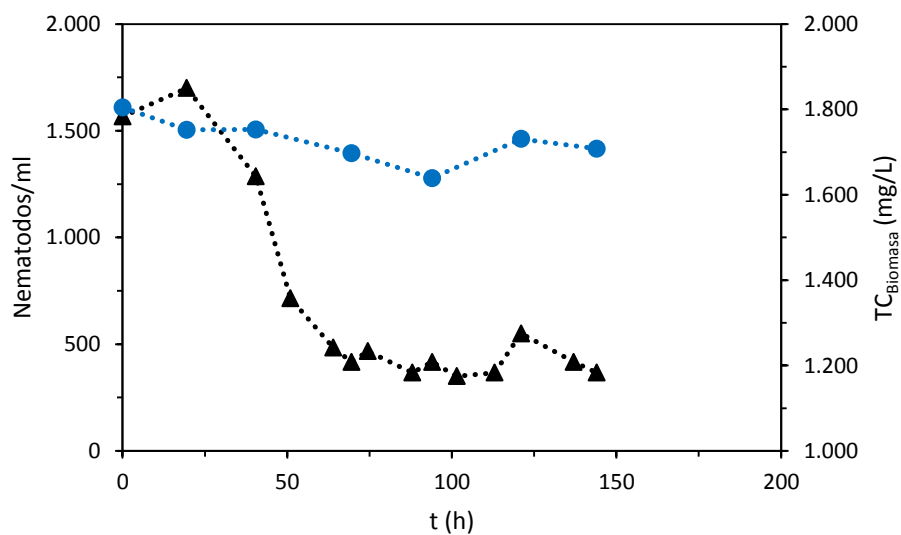


Figura IV. 7. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 46

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,22	0,815	1,41	12,2	-
Final = 144	2,07	0,657	1,42	9,7	0,614

Tabla IV. 47

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.569	2.654	85	771
20	2.457	2.554	97	724
41	2.340	2.452	112	713
70	2.264	2.391	127	731
94	2.143	2.288	145	721
121	2.065	2.206	141	737
144	1.934	2.090	156	734

Tabla IV. 48

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	845	849	5	232
20	788	802	13	243
41	684	699	14	249
70	679	694	15	265
94	631	649	18	269
121	445	476	31	234
144	353	382	29	216

Tabla IV. 49

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B8 Fango de 12-ene-2015 Q: 0,5 (L/min)

T: 20 (°C) pH: sin control Agitación: 260 (rpm) Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,03	16,9	1.117
20	6,83	16,6	2.717
43	6,82	16,8	6.383
51	7,14	16,8	8.771
65	7,03	17,2	13.000
70	7,02	17,2	17.600
75	7,28	17,2	20.057
89	7,35	17,5	36.867
94	7,33	17,5	34.600
100	7,26	17,5	29.600
114	7,64	17,5	17.467
122	7,35	17,7	14.333
138	7,43	18,0	11.933
146	7,48	17,9	11.067

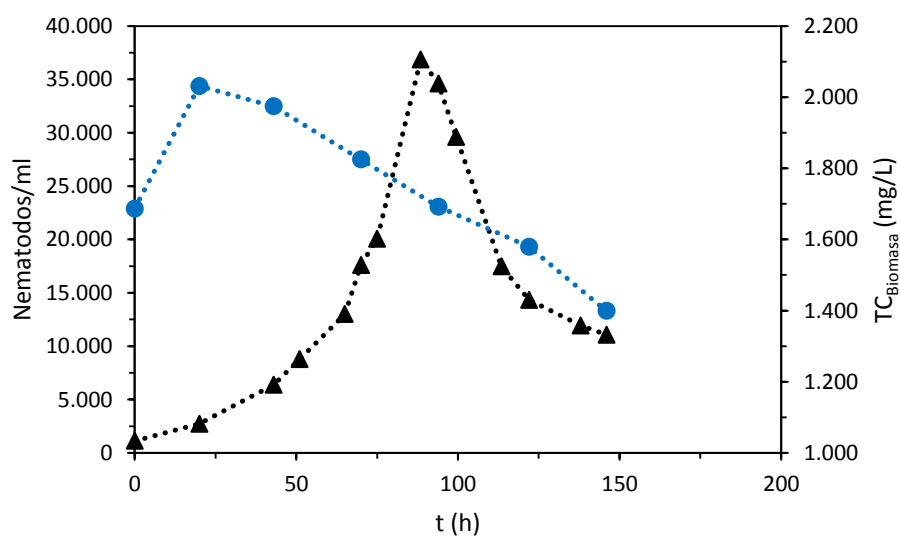


Figura IV. 8. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 50

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,22	0,804	1,42	16,5	-
Final = 146	2,01	0,563	1,44	7,3	0,282

Tabla IV. 51

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.277	2.603	326	728
20	2.050	2.508	458	706
43	1.914	2.319	406	729
70	1.800	2.171	371	680
94	1.657	2.000	343	701
122	1.556	1.863	307	700
146	1.413	1.685	272	663

Tabla IV. 52

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	887	917	29	224
20	431	477	46	197
43	301	345	44	164
70	294	346	52	209
94	256	309	53	225
122	231	284	53	246
146	229	286	57	266

Tabla IV. 53

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B9

Fango de 12-ene-2015

Q: 1 (L/min)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Agitación: 260 (rpm)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	5,96	16,2	2.067
20	6,87	16,2	3.367
41	7,02	16,5	7.371
51	7,18	16,6	11.733
64	7,30	17,0	25.400
70	7,31	17,1	35.067
75	7,19	17,1	44.720
88	7,39	17,4	61.000
94	7,35	17,4	58.800
102	7,36	17,5	43.467
113	7,39	17,6	27.800
121	7,44	17,8	23.800
137	7,55	18,0	20.571
144	7,47	18,0	13.200

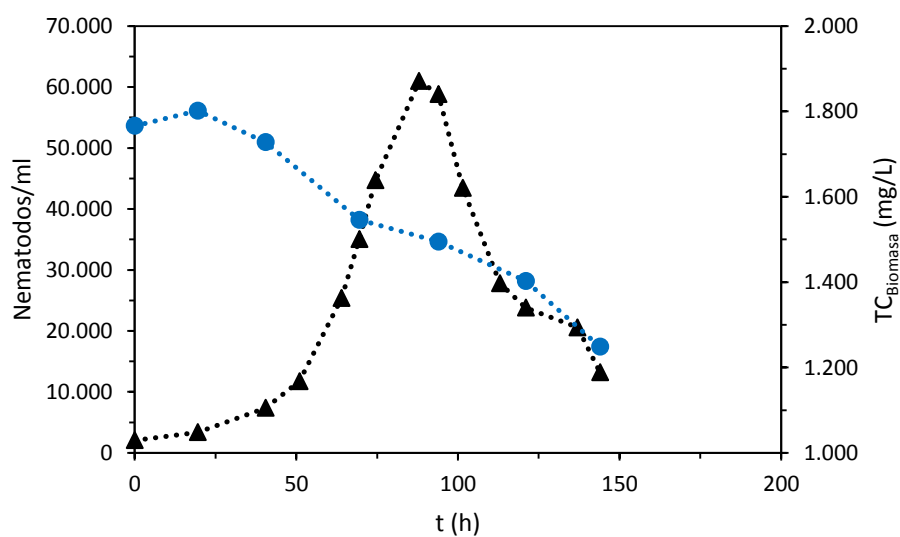


Figura IV. 9. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 54

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,20	0,814	1,39	13,1	-
Final = 144	2,09	0,606	1,48	8,3	2,152

Tabla IV. 55

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.660	2.829	169	764
20	2.393	2.379	186	714
41	2.160	2.368	207	742
70	1.929	2.130	200	727
94	1.810	1.982	172	727
121	1.739	1.907	167	706
144	1.590	1.940	162	732

Tabla IV. 56

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.059	1.063	4	280
20	753	778	25	317
41	609	640	32	297
70	550	584	34	325
94	456	487	32	309
121	472	504	32	338
144	471	503	32	331

Tabla IV. 57

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B10

Fango de 11-mar-2015

Q: 1,5 (L/min)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Agitación: 260 (rpm)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,12	16,4	617
18	6,63	16,7	1.267
24	6,97	16,5	1.717
31	6,94	16,6	2.608
43	7,05	16,8	5.933
48	6,94	17,0	6.400
54	6,94	16,9	7.633
67	6,97	17,1	-
72	7,07	17,2	7.950
78	7,05	17,3	-
90	7,16	17,6	8.267
95	7,12	17,4	9.333
102	7,20	17,7	8.067
115	7,32	17,8	5.933
122	7,29	17,9	6.400
145	7,35	18,1	2.933

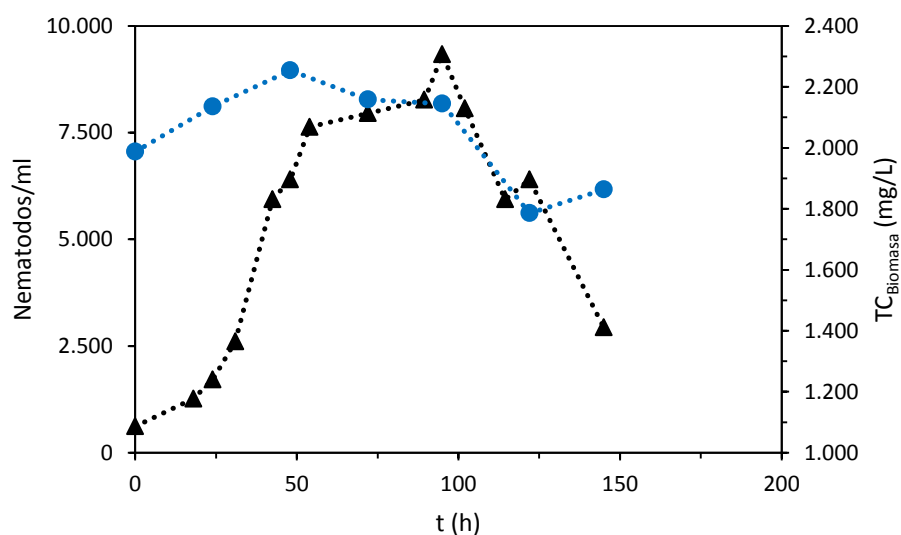


Figura IV. 10. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 58

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,20	0,782	1,42	11,1	-
Final = 145	2,20	0,669	1,53	10,5	2,73

Tabla IV. 59

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.130	2.433	304	528
24	2.339	2.738	399	570
48	2.407	2.803	396	600
72	2.398	2.763	366	629
95	2.418	2.799	381	655
122	2.106	2.410	304	680
145	2.206	2.510	303	720

Tabla IV. 60

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	441	446	5	76
24	569	602	34	166
48	515	549	34	164
72	564	605	42	179
95	607	654	47	206
122	578	625	47	204
145	597	646	49	216

Tabla IV. 61

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Nº Experimento: B11 Fango de 11-mar-2015

Q: 2 (L/min)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Agitación: 260 (rpm)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,11	16,4	517
18	6,71	16,7	1.108
24	7,02	16,6	1.533
31	7,04	16,7	2.458
43	6,94	16,8	5.550
48	7,01	16,9	6.133
54	7,06	17,1	8.400
67	6,99	17,4	14.267
72	7,00	17,5	17.767
78	7,12	17,6	22.167
90	7,00	17,8	34.467
95	7,25	18,4	35.267
102	7,26	18,0	26.133
115	7,32	18,2	20.267
122	7,26	18,4	17.800
145	7,26	18,7	13.133

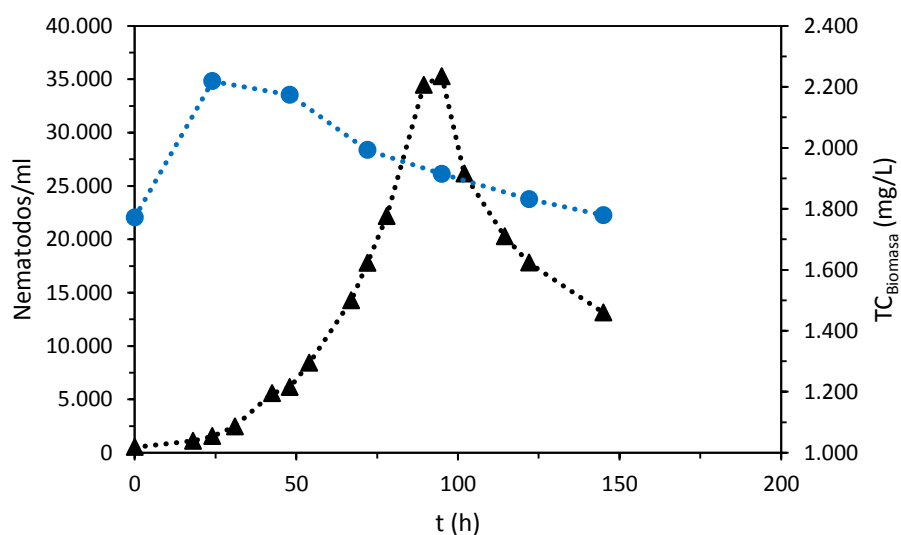


Figura IV. 11. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 62

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,20	0,785	1,41	10,6	-
Final = 145	2,25	0,662	1,59	8,0	2,67

Tabla IV. 63

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.396	2.713	316	577
24	2.350	2.702	449	612
48	2.330	2.741	411	637
72	2.260	2.608	348	622
95	2.190	2.447	352	615
122	2.127	2.472	345	601
145	2.081	2.384	302	591

Tabla IV. 64

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	903	942	39	165
24	528	581	53	163
48	516	567	51	162
72	563	615	52	186
95	574	628	54	200
122	587	641	54	214
145	550	605	54	216

Tabla IV. 65

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B12 Fango de 12-ene-2015 Q: 3 (L/min)

T: 20 (°C) pH: sin control Agitación: 260 (rpm) Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,00	16,8	1.100
20	6,96	16,8	3.800
43	7,17	17,3	11.100
51	7,15	17,4	13.267
65	7,29	17,9	25.767
70	7,21	17,8	35.200
75	7,18	18,0	43.067
89	7,19	18,3	57.400
94	7,40	18,1	56.333
100	7,18	18,4	43.600
114	7,53	18,7	32.800
122	7,50	18,8	26.467
138	7,57	19,3	19.933
146	7,34	19,3	15.400

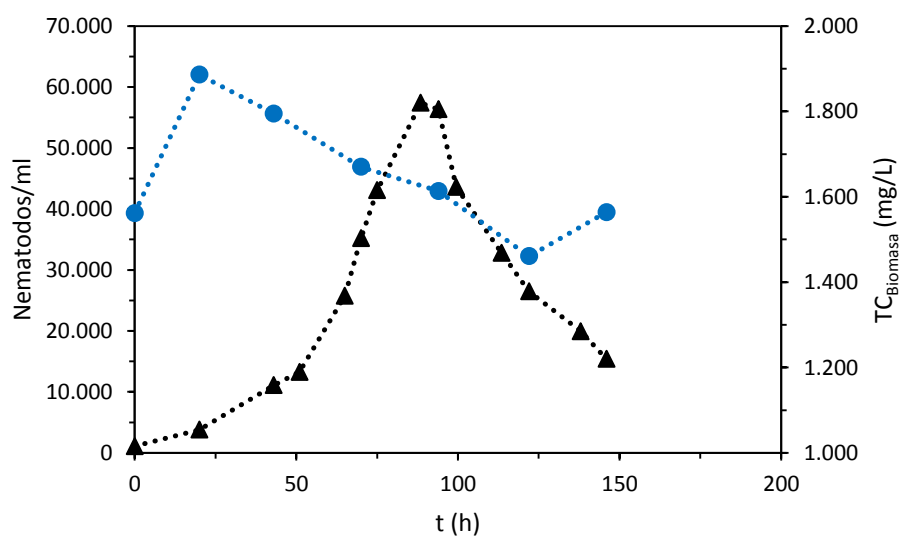


Figura IV. 12. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 66

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,23	0,815	1,41	13,0	-
Final = 146	2,41	0,786	1,63	11,9	6,57

Tabla IV. 67

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.984	2.448	464	628
20	2.012	2.434	422	695
43	1.932	2.297	364	694
70	1.878	2.169	291	704
94	1.853	2.137	284	700
122	1.780	2.133	250	702
146	1.883	2.263	223	705

Tabla IV. 68

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	851	887	35	216
20	499	548	49	220
43	452	502	50	199
70	448	500	52	228
94	472	523	52	251
122	518	569	52	271
146	645	699	55	287

C) Influencia de la agitación mecánica

Adicionalmente al efecto de la concentración inicial de sustrato y la aireación, se ha estudiado la influencia de la agitación mecánica en el crecimiento de *C. elegans*. Para ello se han aplicado diversas velocidades de agitación al cultivo: 0, 40, 80, 100, 220, 300 y 400 rpm con un aspa de tipo “U”. Por su parte, la concentración inicial de sustrato se fijó en un 25% v/v, el caudal de aireación en 1 L/min y la temperatura a 20°C.

El crecimiento de la población de nematodos, el pH y la conductividad eléctrica a lo largo de cada experimento se muestran en las tablas IV.69, IV.73, IV.77, IV.81, IV.85, IV.89 y IV.93.

Las figuras IV.13-IV.19 muestran el crecimiento de la población de nematodos y las fluctuaciones del carbono total de la biomasa (fango + nematodos) a lo largo del experimento.

El seguimiento diario de los valores del carbono y nitrógeno tanto en el efluente global como en el agua tratada queda recogido en las tablas IV.71, IV.72, IV.75, IV.76, IV.79, IV.80, IV.83, IV.84, IV.87, IV.88, IV.91, IV.92, IV.95 y IV.96. De igual manera, se han determinado a tiempo inicial y final los sólidos totales, la materia orgánica, las cenizas, la demanda química de oxígeno y la materia grasa (tablas IV.70, IV.74, IV.78, IV.82, IV.86, IV.90 y IV.94).

Tabla IV. 69

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B13

Fango de 12-jun-2015

Agitación: 0 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,09	16,3	683
14	6,31	16,3	788
19	6,43	16,3	1.290
24	6,76	16,4	1.967
38	7,04	16,5	3.667
43	6,93	16,6	4.350
48	6,95	16,6	5.017
62	7,02	17,0	9.833
67	7,08	17,1	12.633
72	7,22	17,2	14.633
86	7,37	17,4	21.467
91	7,27	17,5	21.900
96	7,25	17,5	23.800
110	7,20	17,7	17.033
120	7,27	17,7	12.000
134	7,40	17,8	6.800
144	7,47	17,8	5.167

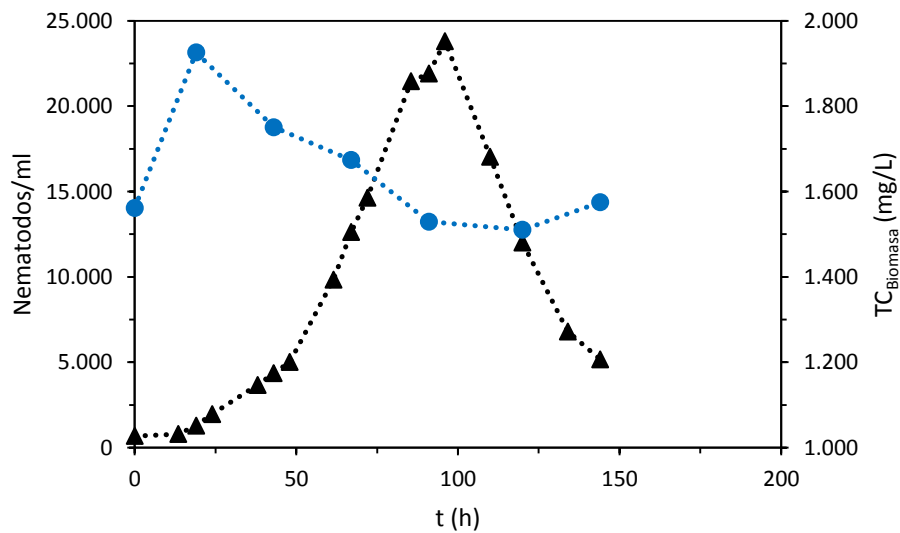


Figura IV. 13. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 70

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,27	0,848	1,43	11,4	-
Final = 144	2,12	0,617	1,51	9,01	1,83

Tabla IV. 71

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.891	2.430	539	551
19	2.159	2.637	478	638
43	1.942	2.348	406	600
67	1.854	2.291	438	596
91	1.687	2.098	411	572
120	1.629	1.989	359	549
144	1.626	2.068	443	548

Tabla IV. 72

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	809	869	60,6	167
19	636	711	75,9	181
43	520	598	77,4	191
67	533	618	84,4	216
91	484	569	84,8	230
120	395	478	83,9	224
144	411	494	82,7	208

Tabla IV. 73

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B14

Fango de 13-may-2015

Agitación: 40 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,11	16,8	1.067
16	6,41	16,5	1.433
38	7,16	16,9	2.600
47	7,26	17,0	3.883
61	7,29	17,4	10.800
66	7,28	17,6	12.967
72	7,26	17,5	15.200
84	7,56	17,8	12.467
91	7,48	17,9	9.900
96	7,60	18,0	7.800
109	7,76	18,0	6.267
117	7,80	18,2	5.300
146	7,84	18,4	2.200

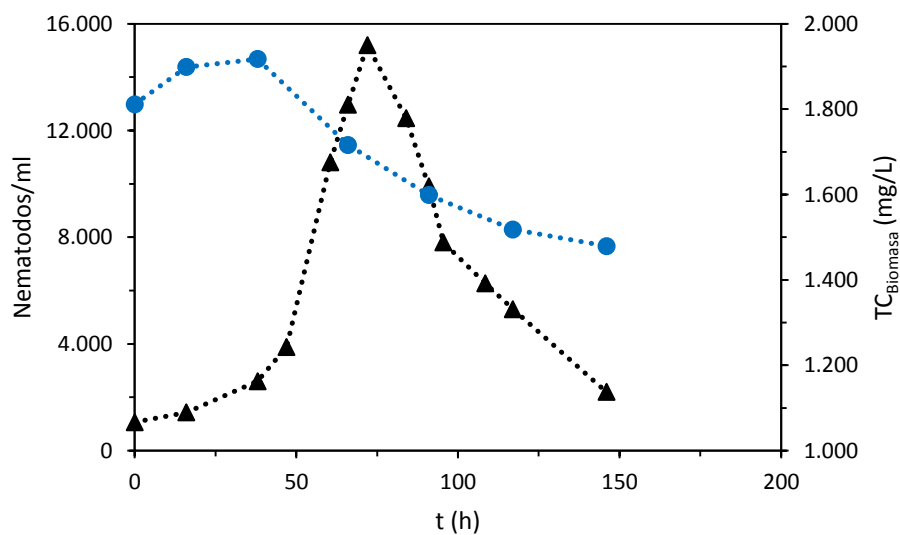


Figura IV. 14. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 74

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,23	0,795	1,43	12,2	-
Final = 146	2,11	0,570	1,54	8,2	0,787

Tabla IV. 75

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	2.340	2.657	317	631
16	2.140	2.533	394	577
38	1.914	2.377	463	550
66	1.774	2.151	377	566
91	1.662	2.009	347	569
117	1.582	1.902	320	558
146	1.515	1.837	323	550

Tabla IV. 76

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	780	845	66	132	-
16	566	635	69	133	-
38	386	459	73	170	-
66	358	435	77	193	-
91	337	410	73	203	-
117	318	385	66	206	-
146	304	358	55	209	2,06

Tabla IV. 77

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B15

Fango de 11-mar-2015

Agitación: 80 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,17	16,7	825
17	6,81	16,8	1.133
22	7,25	16,8	1.558
27	7,24	16,6	1.575
41	7,23	16,9	2.400
46	7,33	17,0	2.771
51	7,45	17,0	3.400
65	7,34	17,4	9.867
69	7,35	17,5	11.000
75	7,52	17,5	14.167
89	7,60	17,6	24.000
99	7,67	17,8	22.400
113	7,44	18,1	13.867
122	7,37	18,0	11.467
138	7,54	18,3	8.533
145	7,56	18,4	6.200

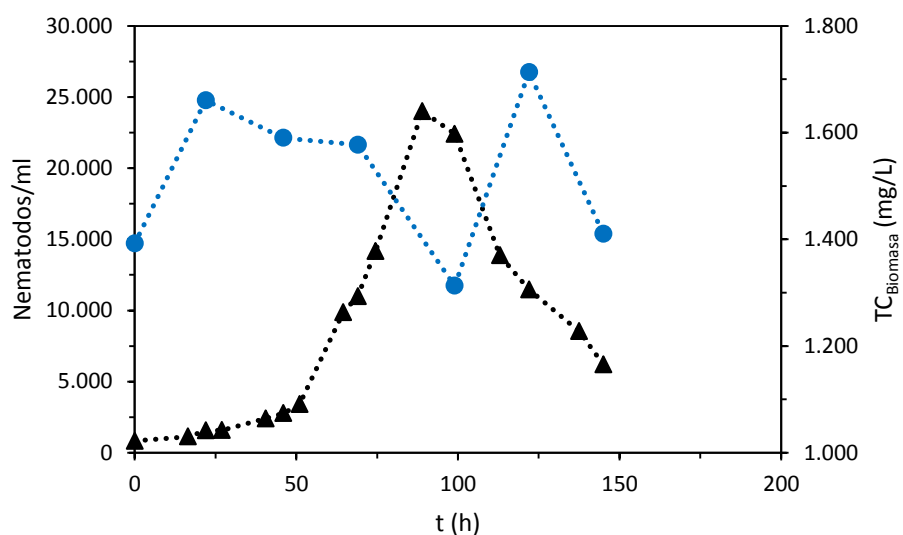


Figura IV. 15. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 78

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,17	0,752	1,42	11,5	-
Final = 145	2,04	0,545	1,49	7,1	0,825

Tabla IV. 79

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	1.810	2.296	487	547	-
22	1.785	2.351	565	608	-
46	1.671	2.200	530	561	-
69	1.619	2.101	482	600	31,5
99	1.371	1.810	439	541	-
122	1.767	2.182	416	564	33,8
145	1.447	1.854	407	562	-

Tabla IV. 80

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	848	904	57	205	0
22	624	690	66	237	0
46	545	610	65	238	0
69	455	524	69	235	0
99	424	497	73	231	0
122	396	469	73	257	1,37
145	368	443	75	243	1,79

Tabla IV. 81

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B16

Fango de 12-jun-2015

Agitación: 100 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,00	16,2	775
14	6,29	16,3	1.175
19	6,38	16,2	1.400
24	6,72	16,6	1.967
38	6,94	16,5	2.400
43	7,07	16,6	3.133
48	7,06	16,7	-
62	7,18	17,0	8.133
67	7,19	17,0	-
72	7,23	17,1	12.800
86	7,31	17,4	12.233
91	7,19	17,5	9.400
96	7,21	17,5	7.467
110	7,27	17,6	5.167
120	7,46	17,7	4.400
134	7,52	17,9	3.500
144	7,59	18,0	3.333

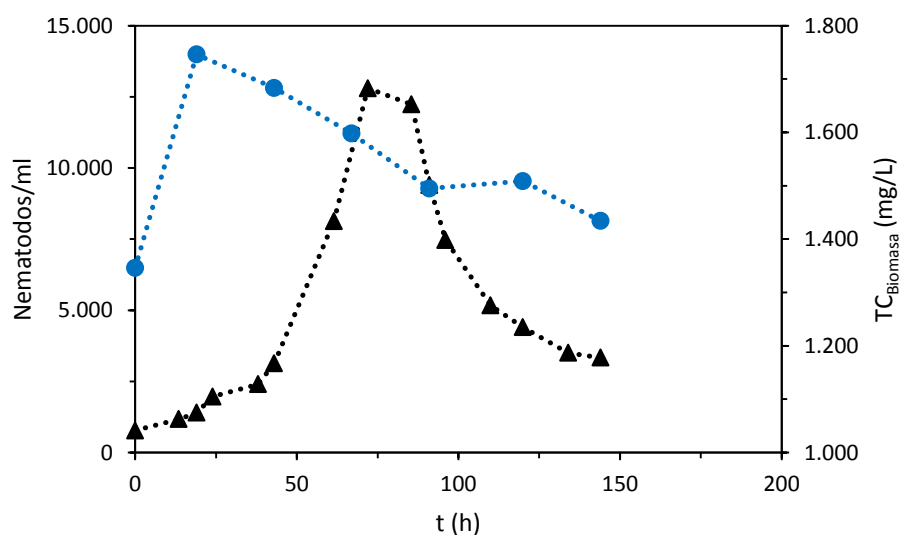


Figura IV. 16. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 82

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,26	0,823	1,44	12,31	-
Final = 144	2,10	0,584	1,51	7,66	0,455

Tabla IV. 83

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.929	2.391	462	554
19	1.990	2.436	445	581
43	1.894	2.270	376	586
67	1.787	2.175	388	571
91	1.672	2.023	351	562
120	1.631	1.996	366	555
144	1.656	1.970	314	531

Tabla IV. 84

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.005	1.046	41	205
19	637	690	53	202
43	529	587	58	209
67	521	577	56	238
91	476	528	53	237
120	459	488	29	243
144	488	536	49	242

Tabla IV. 85

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B17

Fango de 13-may-2015

Agitación: 220 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,04	16,4	1.075
16	6,47	16,5	1.933
38	7,23	16,7	3.900
47	7,29	16,9	4.600
61	7,20	17,3	11.200
66	7,27	17,3	12.733
72	7,44	17,5	11.733
84	7,66	17,7	11.533
91	7,46	17,8	8.050
96	7,67	17,7	8.000
109	7,94	17,9	6.067
117	7,73	17,9	4.400
146	7,75	18,2	1.867

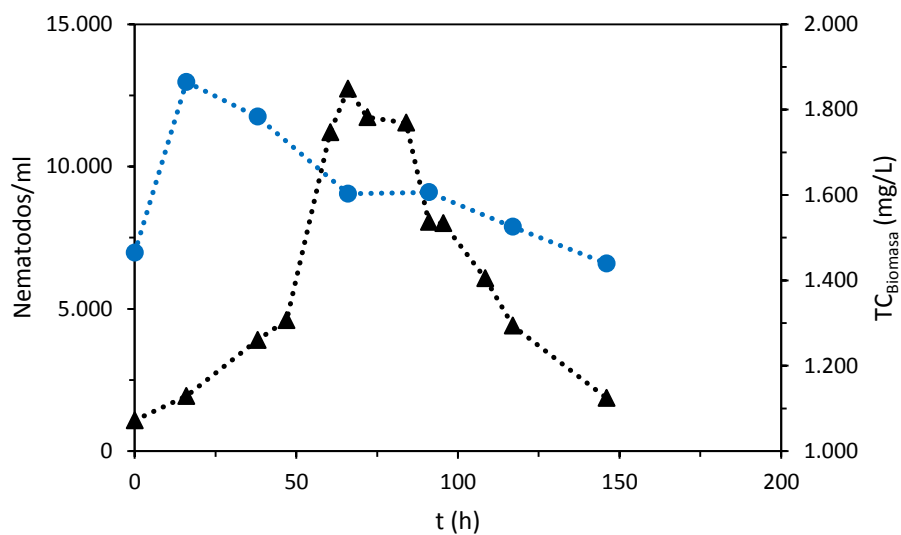


Figura IV. 17. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 86

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,24	0,805	1,44	11,8	-
Final = 146	2,11	0,595	1,51	8,6	0,888

Tabla IV. 87

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	1.783	2.250	467	529	-
16	1.893	2.407	514	543	-
38	1.792	2.177	385	577	-
66	1.622	1.996	374	562	-
91	1.596	1.994	399	564	38,7
117	1.552	1.887	336	534	-
146	1.471	1.801	330	535	-

Tabla IV. 88

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	703	786	83	138	-
16	453	543	89	122	-
38	302	393	91	143	-
66	298	393	96	174	-
91	296	388	92	186	-
117	274	362	88	187	-
146	269	362	93	203	2,32

Tabla IV. 89

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B18

Fango de 11-mar-2015

Agitación: 300 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	6,31	16,8	683
17	7,14	16,6	1.467
22	7,12	16,7	1.858
27	7,29	16,8	2.283
41	7,37	17,0	3.600
46	7,39	17,1	5.867
51	7,46	17,2	9.117
65	7,56	17,4	31.133
69	7,58	17,5	33.000
75	7,65	17,6	42.133
89	7,61	17,8	57.067
99	7,76	18,0	52.933
113	7,43	18,3	51.733
122	7,45	18,2	48.933
138	7,55	18,6	28.466
145	7,55	18,5	23.533

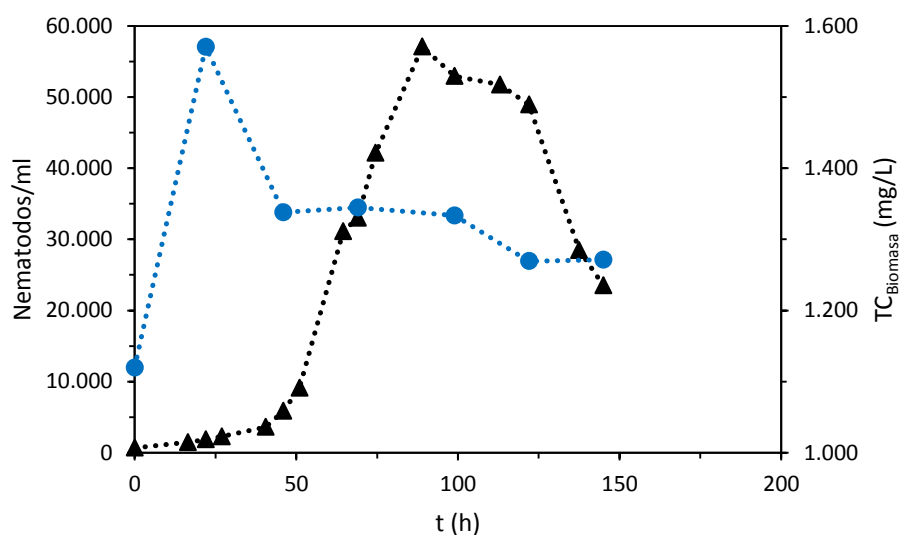


Figura IV. 18. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 90

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,18	0,759	1,42	11,4	-
Final = 145	2,11	0,581	1,53	8,8	2,688

Tabla IV. 91

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	1.649	2.152	502	504	-
22	1.782	2.250	468	600	-
46	1.524	1.920	396	529	18,5
69	1.485	1.924	439	547	-
99	1.438	1.839	401	513	-
122	1.390	1.796	406	488	-
145	1.443	1.823	380	550	-

Tabla IV. 92

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	NN (mg/L)
0	987	1.032	46	216	6,45
22	609	679	71	234	-
46	511	582	71	225	-
69	496	579	83	244	2,81
99	436	506	70	234	-
122	449	527	78	240	-
145	471	552	81	255	-

Tabla IV. 93

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE NEMATODO

Experimento: B19

Fango de 12-jun-2015

Agitación: 400 (rpm)

T: 20 (°C)

pH: sin control

Q: 1 (L/min)

Medio de cultivo: 25% Fango (v/v)

t (h)	pH	CE (mS/cm)	Nematodos/ml
0	5,90	16,2	625
14	6,31	16,4	1.075
19	6,42	16,3	1.383
24	6,85	16,4	1.817
38	7,07	16,5	3.525
43	6,92	16,5	5.050
48	6,94	16,7	5.867
62	7,00	16,9	8.133
67	7,05	17,0	7.720
72	7,27	17,1	6.800
86	7,23	17,3	7.500
91	7,19	17,4	6.133
96	7,08	17,4	6.400
110	7,36	17,6	6.800
120	7,45	17,7	7.200
134	7,48	17,8	5.167
144	7,49	17,8	4.200

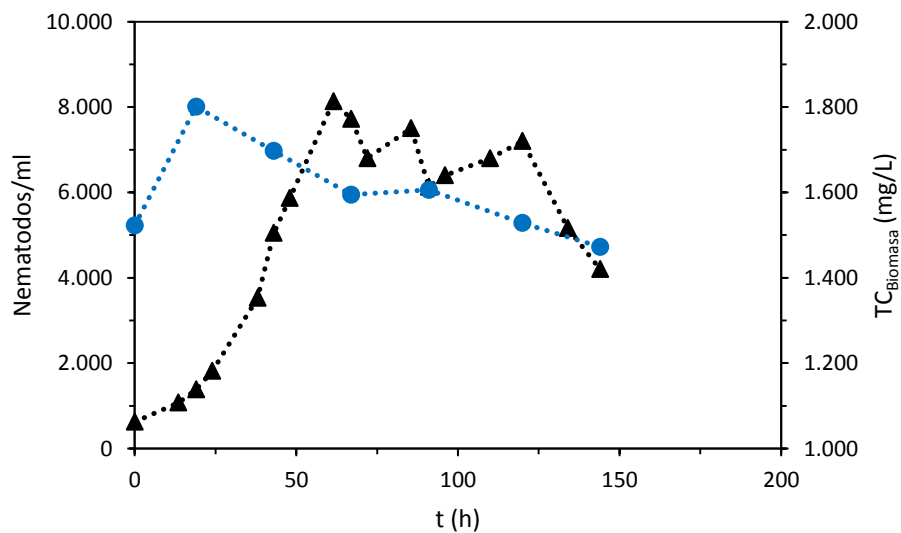


Figura IV. 19. Crecimiento de la población de nematodos (▲) y la biomasa total (●) en función del tiempo de operación.

Tabla IV. 94

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL

t (h)	ST (%)	SV (%)	SNV (%)	DQO (g/L)	Materia grasa (%)
Inicial = 0	2,25	0,825	1,43	12,1	-
Final = 144	2,08	0,579	1,50	6,7	0,278

Tabla IV. 95

CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GLOBAL EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	1.903	2.413	509	546
19	1.924	2.426	502	570
43	1.800	2.216	416	585
67	1.698	2.079	381	568
91	1.619	2.024	405	580
120	1.522	1.934	412	557
144	1.479	1.895	417	526

Tabla IV. 96

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO

t (h)	COT (mg/L)	CT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
0	835	891	55	171
19	555	625	70	172
43	443	519	77	183
67	412	485	73	195
91	343	419	76	197
120	339	406	68	199
144	359	423	64	200

IV.3. Lípidos totales y perfil de ácidos grasos

El estudio del contenido de materia grasa total y los perfiles de ácidos grasos del nematodo se ha realizado en matraces en orbital rotatorio para el nematodo alimentado con fango del espesador secundario o medio estándar S-Medio cuya fuente de carbono es *E. coli*.

El porcentaje de materia grasa para diferentes estirpes de *C. elegans* se muestra en la tabla IV.97 y se determinó realizando una extracción sólido-líquido mediante el método Soxhlet.

Tabla IV. 97. Lípidos totales obtenidos en diferentes estirpes y estadios poblacionales de *C. elegans*.

Estirpe de <i>C. elegans</i>	Fenotipo	Proporción de cada estadio poblacional (%)				Medio de cultivo	Materia grasa (% p.s)	± DS
		L1 y L2	Dauers	L3 y L4	Adultos			
N2	Silvestre	90%	5%	4%	1%	Fango*	4,52	-
N2	Silvestre	90%	5%	4%	1%	<i>E. coli</i>	6,81	1,58
N2	Silvestre	30%	65%	5%	5%	<i>E. coli</i>	10,8	0,911
<i>daf-2 (e1370)</i>	Descrito como obeso	90%	5%	4%	1%	<i>E. coli</i>	6,22	-
<i>daf-2 (e1370)</i>	Descrito como obeso	15%	80%	4%	1%	<i>E. coli</i>	10,2	-
<i>ire-1 (v33)</i>	Descrito como obeso	90%	5%	4%	1%	<i>E. coli</i>	6,08	0,170
<i>unc-31 (e169)</i>	Mutante de movilidad	90%	5%	4%	1%	<i>E. coli</i>	7,61	-
<i>mod-1 (ok103)</i>	Mutante de movilidad	35%	60%	4%	1%	<i>E. coli</i>	8,14	0,140

*Porcentaje obtenido a partir de nematodos crecidos en placa de Petri.

**Saturación = 90% L1 y L2; 5% dauer; 4% L3 y L4; 1% adultos.

Por otra parte, la determinación del perfil de ácidos grasos en la fracción lipídica se ha realizado mediante cromatografía de gases para biomasa de nematodo crecido a partir de fango o de *E. coli* (S-Medio) (Tabla IV.98).

Tabla IV. 98. Perfil de ácidos grasos para el nematodo crecido a partir de fango del espesador secundario o de *E. coli*. Ensayos realizados en placa de Petri.

Ácido graso	Porcentaje relativo de cada ácido graso (%)	
	Nematodos crecidos en fango	Nematodos crecidos en <i>E. coli</i>
10:0	0,420	1,03
12:0	1,27	3,47
14:0	0,220	0,270
16:0	3,02	4,17
16:1	2,06	1,09
17:0	4,75	2,73
18:0	9,13	9,69
18:1n9T	3,93	4,81
18:1n7	25,1	9,27
18:2n6T	5,92	9,20
20:0	0,620	0,810
18:3n3	0,120	0,260
20:3n6	6,22	9,58
22:0	1,15	0,860
20:4n6	2,61	5,78
20:4n3	10,3	9,50
20:5n3	23,2	27,5

IV.4. Efecto de pretratamientos del fango en la población de nematodos

El crecimiento de la población de nematodos es dependiente de la heterogeneidad del fango como se observa en las variaciones encontradas para diferentes fechas. Por tanto, se ha planteado como hipótesis que la aplicación de pretratamientos al fango pudiera homogeneizar su potencial como alimento para el nematodo y obtener un aumento del crecimiento de *C. elegans*; como consecuencia de un mayor aprovechamiento de la materia orgánica presente en el fango. Por ello, se ha estudiado el efecto de los siguientes pretratamientos: microondas (Tabla IV.99), choque térmico (Tabla IV.100) y sonicación (Tabla IV.101).

Tabla IV. 99. Efecto del pretratamiento del fango con microondas en el crecimiento de *C. elegans*. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio con fango del espesador secundario 15-octubre-15 con una concentración del 50% v/v.

Nematodos/ml				
Tiempo (h)	Sin pretratamiento	Tiempo de pretratamiento con microondas (s)		
		60 (s)	120 (s)	180 (s)
0	538	475	675	450
69	28.066	33.633	31.900	30.933
93	44.133	54.766	54.233	54.800
117	58.367	85.867	79.733	83.033
141	63.200	90.100	84.200	84.467
165	46.500	81.133	73.866	71.400

Tabla IV. 100. Influencia del pretratamiento del fango por choque térmico durante 3 minutos en el crecimiento de *C. elegans*. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio con fango 15-octubre-15 con una concentración del 50% v/v.

Nematodos/ml				
Tiempo (h)	Sin pretratamiento	Temperatura de pretratamiento (°C)		
		40 (°C)	80 (°C)	100 (°C)
0	600	550	550	600
69	18.967	17.400	8.966	7.250
93	38.733	38.300	23.733	19.100
117	49.400	46.966	28.933	25.300
141	47.433	45.533	21.633	26.667
165	44.033	34.733	20.900	18.600

Tabla IV. 101. Efecto del pretratamiento del fango por sonicación en el crecimiento de *C. elegans*. Ensayos realizados en matraces en orbital rotatorio con fango del espesador secundario 15-octubre-15 con una concentración del 50% v/v.

Nematodos/ml					
Tiempo (h)	Sin pretratamiento	Tiempo de pretratamiento (s) y potencia de sonicación (%)			
		60 (s) 50 (%)	120 (s) 50 (%)	180 (s) 50 (%)	120 (s) 100 (%)
0	400	513	463	463	375
69	15.667	16.366	14.466	15.667	17.100
93	34.133	51.733	49.767	50.733	50.667
117	53.233	65.533	68.600	66.433	60.333
141	48.700	68.733	64.533	67.967	62.100
165	52.000	61.500	65.700	65.166	67.233

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

V.1. Composición físico-química de los fangos de EDAR y elección del fango para el cultivo de *C. elegans*

A los diferentes fangos generados en la EDAR se les ha realizado una caracterización físico-química (Tabla IV.1). Todos los fangos tienen un pH superior a 5,79 e inferior a 7,16. La conductividad eléctrica es similar en todos los casos, admitiendo un valor medio de $1,65 \pm 0,347$, menos en el caso del fango generado después de la digestión anaerobia (5,59 mS/cm). Los sólidos totales (ST) varían entre 0,54-3,91% registrándose los valores más elevados para los fangos del espesador secundario y de la cámara de mezcla con 3,38 y 3,91%, respectivamente. Un comportamiento similar se observa para el resto de los parámetros SV, DQO, CT, COT, CI y NT. Incluso, esta tendencia se ha observado en la caracterización de las fases líquidas que se han separado por centrifugación de los diferentes fangos.

En relación al contenido en metales pesados (Tabla IV.2), en general, todos los fangos generados a lo largo del proceso de depuración analizados muestran niveles bajos en metales pesados (< 1 mg/L). Solamente, los iones metálicos Fe, Zn y Cu muestran concentraciones relativamente altas. El hierro muestra altos valores en los fangos de los espesadores primario y secundario, cámara de mezcla y el del digestor anaerobio 223; 87,8; 68,8; y 680 mg/L, respectivamente. El zinc en los fangos de los espesadores primario y secundario y en el digestor anaerobio 5,22; 11,2 y 22,9 mg/L, respectivamente. El cobre en los fangos de los espesadores primario y secundario y en el digestor anaerobio 3,37; 3,52 y 6,12 mg/L, respectivamente.

De las tablas indicadas anteriormente, se observa que el fango con mayor contenido en sólidos volátiles (SV) es el procedente del espesador secundario, por lo que existe mayor cantidad de materia orgánica (COT = 9.970 mg/L) susceptible de ser degradada por el nematodo que en los otros cuatro fangos también estudiados. En este sentido, cabe indicar que los tres parámetros claves en la caracterización de los fangos son el contenido en materia orgánica, el carbono orgánico total y el nitrógeno total puesto que determinarán el potencial nutricional del fango como medio nutriente para *C. elegans*. De hecho, la materia orgánica constituye indica la cantidad de residuo potencialmente digerible por el nematodo; lo cual se ha denominado en este trabajo como: “conversión de materia orgánica de fango en biomasa de nematodo” y se expresa en porcentaje (%). De hecho, otros autores que utilizan oligoquetos como organismos depredadores del fango, consideran que los ratios SV/ST y NT/ST pueden ser unos indicativos del valor nutritivo del fango (Hendrickx et al., 2010b). En este sentido, estos mismos autores han determinado para esos fangos los siguientes rangos 0,63-0,76 y 46,0-87,8 para los ratios SV/ST y NT/ST, respectivamente. Dichos valores son del mismo orden de los obtenidos en este trabajo de investigación para el espesador secundario (0,76 y 69,7, respectivamente -Tabla IV.1-).

Por otra parte, hay que señalar que ambas biomasas, de oligoqueto y nematodo, contienen una gran cantidad de proteínas lo que justifica la importancia del nitrógeno en los medios de cultivo de los mismos (Elissen et al., 2010; Lee y Atkinson, 1976).

Una vez determinada la composición físico-química de los diferentes fangos generados en una EDAR, se ha estudiado el crecimiento de *C. elegans* en medios de cultivos formados por cada uno de los fangos generados y a distintas concentraciones de los mismos (1, 2, 10, 50 y 100% v/v). Los experimentos correspondientes se han llevado a cabo en placas Petri como medio sólido y en matraces Erlenmeyer en medio líquido. El objetivo de este estudio es la determinación de la población nematodos en cada caso, para finalmente, proceder a la elección del fango más adecuado para la formación del medio de cultivo.

En las tablas IV.3 y IV.4 se pueden ver los resultados obtenidos en relación a las poblaciones de nematodos determinadas. En medio sólido (placas Petri), las poblaciones más altas se han registrados en los experimentos realizados utilizando fango de recirculación biológica (180.736 nematodos/placa), espesador secundario (172.275 nematodos/placa) y primario (94.493 nematodos/placa) consecutivamente con orden decreciente, respectivamente. En medio líquido, la población de nematodos más alta (45.200 nematodos/ml) se ha registrado en los medios de cultivos formados a partir del fango del espesador secundario, con gran diferencia respecto a los otros fangos (Tabla IV.4).

Por otra parte, es importante indicar que el fango del espesador primario permite relativamente un elevado crecimiento poblacional del nematodo en placas de agar (94.493 nematodos/placa); a pesar de ello, se ha descartado este fango por mostrar menor crecimiento de la población de nematodos en medio líquido (9.732 nematodos/ml) y por la observación de abundantes residuos sólidos (pelos, grumos, arenas, etc.) que podrían dificultar la homogeneización del medio de cultivo y el acceso a los nutrientes por parte de *C. elegans*, considerando que el nematodo cuenta con un orificio bucal entre 0,5-3,5 μm de diámetro, siendo máximo en la adultez (WormAtlas, 2017).

Con el objetivo de acotar la búsqueda del mejor fango a utilizar para la formación de los medios de cultivos. En la tabla IV.5 se puede ver una comparativa entre medios de cultivos formados a partir de fango procedente de la recirculación biológica y fango del espesador secundario; obtenidos a diferentes fechas a lo largo del año y a distintas diluciones 50 y 100% (v/v) en medio de cultivo líquido. La máxima población de nematodos se ha registrado en los medios formados a partir del fango secundario (146.666 nematodos/ml en fango sin dilución). Por otra parte, se ha procedido a la concentración del fango obtenido a partir de la recirculación biológica

con el objetivo de aumentar la materia orgánica disponible para el crecimiento de los nematodos. En estos casos, la máxima población obtenida ha sido de 71.516 nematodos al concentrar el volumen del fango procedente de la recirculación biológica de 1.000 ml a 250 ml (Tabla IV.4). Por lo que finalmente, se ha optado por utilizar el fango generado en el espesador secundario para el desarrollo de todas las series experimentales a posteriori.

En la tabla IV.6 se puede observar que la composición físico-química del fango procedente del espesador secundario no muestra grandes variaciones a lo largo del año. De hecho, en la misma tabla se pueden ver los valores medios y la desviación estándar para cada uno de los parámetros determinados. A título de ejemplo pH = $3,32 \pm 0,149$, conductividad eléctrica = $2,61 \pm 0,949$ mS/cm, sólidos totales = $2,66 \pm 0,355$ %, carbono orgánico total = $8,2 \pm 2,68$ g/L, etc.

Finalmente, en la caracterización del fango del espesador secundario, se valoró también la posibilidad de que la concentración de metales pesados en éste, pudiera impedir el crecimiento de *C. elegans*; por lo que se ha realizado un estudio bibliográfico de la tolerancia del nematodo a estos metales, teniendo en cuenta la concentración de los distintos metales determinada mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (Tabla IV.2). Para algunos metales no está reportado bibliográficamente un posible efecto negativo pero muestran una concentración casi despreciable (Tabla V. 1). De hecho, el hierro presenta la concentración más elevada en fango; sin embargo, es un elemento que se añade en el medio de cultivo estándar de *C. elegans* en una concentración de 21,1 mg/L para favorecer su crecimiento; por lo tanto, no se espera que sea perjudicial para el nematodo (Wormbook, 2017).

La comparativa de las concentraciones de los metales pesados en fango y los límites de tolerancia del nematodo, sugiere que estos metales no deben condicionar el crecimiento de *C. elegans*, a priori.

Tabla V. 1. Concentración de metales en el fango del espesador secundario y tolerancia de *C. elegans* según datos bibliográficos.

Metal	[Metal] en el fango (mg/L)	[Metal] tolerada por el nematodo (mg/L)	Referencia
Cu	3,37	63,5	(Barsyte et al., 2001)
Cd	0,100	1,50	(Broeks et al., 1996)
Mn	0,990	54,9	(Lin et al., 2006)
Zn	5,22	19,6	(Davis et al., 2009)
Fe	87,8	-	-
Pb	0,610	-	-
Cr	0,100	-	-
Ni	0,600	1,17	(Murphy et al., 2011)
Tl	0,590	-	-

V.2. Crecimiento de *C. elegans* en fango del espesador secundario

Para la correcta evaluación del crecimiento del nematodo *C. elegans*, los experimentos se han llevado a cabo en medio sólido (placas de Petri) y en medio líquido (en matraces Erlenmeyer utilizando orbital rotatorio y en biorreactores tipo tanque agitado de 1 L de capacidad útil).

V.2.1. Cultivos en medio sólido

Como se puede observar en la figura V.1 y tras cinco días de cultivo, se ha eliminado gran parte del fango por el nematodo alcanzando un elevado crecimiento poblacional de nematodos por lo que se demuestra la capacidad de reducción del fango por el nematodo *C. elegans*.

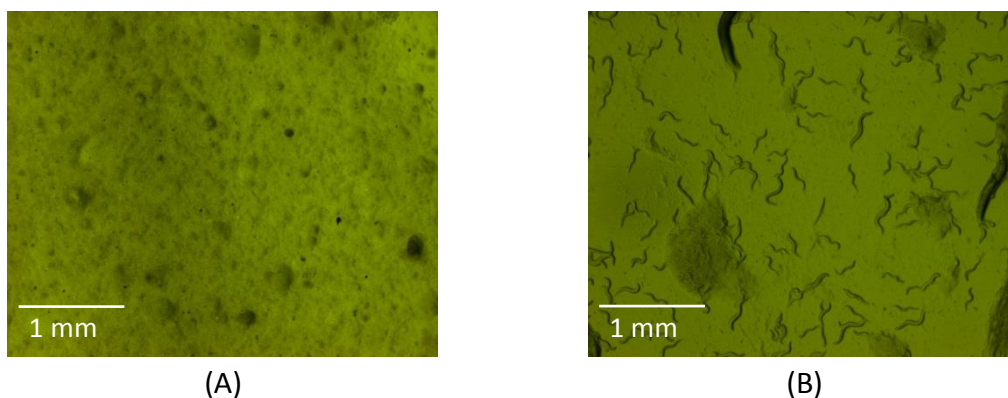


Figura V.1. Imagen de una placa Petri con fango obtenido del espesador secundario: (A) sin inoculación del nematodo y (B) con inóculo inicial de 20 nematodos en estadio L4; tras 5 días a 20°C. Medio de cultivo: Fangos del espesador secundario al 100 % (v/v). Microscopio estereoscópico Olympus SZX16 objetivo 1x; aumento 3x.

En la figura V.2 se observa el crecimiento de la población de nematodos en medio sólido a partir de fangos de distintas fechas y para dos concentraciones 50 y 100 (v/v). En la mayoría de los casos estudiados se ha registrado una población de nematodos superior a 40.000 e inferior a 100.000 nematodos por placa; con las excepciones del fango 20 de septiembre de 2011 que presentó un valor extremo de 172.275 nematodos por placa y de los fangos con fechas del 20 de diciembre de 2011 y 13 de marzo de 2012 que han registrado poblaciones menores: 22.367 y 25.286 nematodos por placa. Por otra parte, respecto a la concentración inicial de fango, en medio sólido no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las poblaciones de nematodos crecidas en fango al 50 y al 100 % (v/v) a lo largo de los años 2011 y 2012 con la excepción de los fangos de fechas 13-oct-11 y 20-dic-11 con mayor

crecimiento de la población al 50 y 100% (v/v), respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que el crecimiento en placas (medio sólido) no se encuentra afectado por la concentración inicial de fango, para las diluciones estudiadas. Sin embargo, esta observación no se cumple en los cultivos realizados en medio líquido como se mostrará más adelante. Posiblemente, este hecho se debe a que en placa hay bacterias capaces de crecer a base de agar pudiendo servir éstas de alimento para el nematodo, además del efecto de concentración de bacterias y de partículas que supone la aplicación directa sobre la superficie del agar que podría actuar como como tamiz.

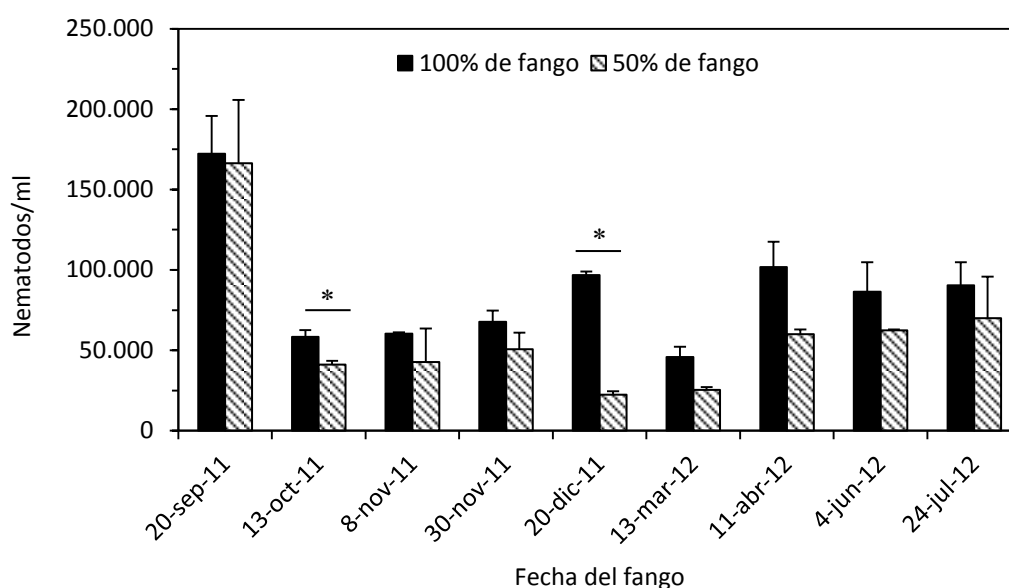


Figura V.2. Crecimiento máximo de la población de nematodos para fangos de distintas fechas entre los años 2011 y 2012. El cultivo se ha realizado en placas de agar con un volumen de 250 μ l de fango por placa procedentes del espesador secundario. Se representan datos para dos concentraciones de fango: 50 y 100 % (v/v). Las barras de error representan la desviación estándar. (*) Se ha aplicado la prueba estadística t-Student, entre medios de cultivos con fango al 50 y al 100 % (v/v), considerándose diferencias significativas entre ambas concentraciones con un p-valor < 0,05.

En adición, a partir de los experimentos realizados en 200 placas y con el objetivo de establecer una relación entre el peso seco y el número de nematodos en situación de saturación (cultivo mixto donde abundan principalmente nematodos en estadios L1 y L2), se ha determinado que 23.874 nematodos equivalen a 1 mg de peso seco (es decir, $4,21 \times 10^{-5}$ mg/nematodo). Este valor es próximo a otros obtenidos para *C. elegans* en medios de cultivo basados en extracto de levadura y en *E. coli* (S-Medio) donde se registraron los siguientes valores $3,63 \times 10^{-5}$ mg/nematodo (27.537 nematodos/mg) y $5,56 \times 10^{-5}$ mg/nematodo (18.000 nematodos/mg), respectivamente (Guerrero, 2011; Jacinto, 2013).

V.2.2. Cultivos en medio líquido

V.2.2.1. Relaciones peso seco, CT, COT, CI, NT y N° de nematodos

El seguimiento del crecimiento poblacional de los nematodos y la determinación de los parámetros de peso seco, CT, COT, CI y NT de la biomasa del nematodo permiten establecer las diferentes relaciones entre sí.

En primer lugar, para el cultivo de referencia en S-medio (*E. coli*) y a partir de la tabla IV.8 se puede calcular el peso seco de un nematodo según la población existente en el cultivo. En este sentido, cabe resaltar que la población de los cultivos de nematodos suele ser mixta pudiendo contener los estadios de huevo, L1, L2, L3, L4, adulto y dauer. Los resultados obtenidos han sido los siguientes: $3,13 \times 10^{-5}$ (a), $5,52 \times 10^{-5}$ (b), $6,40 \times 10^{-5}$ (c), $1,11 \times 10^{-4}$ (d) y $1,47 \times 10^{-4}$ mg/nematodo (e) y los estadios existentes en cada caso han sido: 90% L1 y L2, 5% dauer, 4% L3 y L4 y 1% adultos (a); 85% L1 y L2, 5% dauer, 5% L3 y L4 y 5% adultos (b); 85% L1 y L2, 5% dauer, 5% L3 y L4 y 5% adultos (c); 83% L1 y L2, 5% dauer, 5% L3 y L4 y 7% adultos (d) y 80% L1 y L2, 5% dauer, 5% L3 y L4 y 10% adultos (e), respectivamente. Estos valores son del mismo orden de magnitud de otros obtenidos para *C. elegans* en medio de cultivos basados en extracto de levadura donde se registró un valor de $3,63 \times 10^{-5}$ mg/nematodo (Jacinto, 2013).

En resumen, los adultos son los que más pesan como es de esperar y los estadios L1, L2 y dauers suelen ser los más frecuentes al comienzo de la fase estacionaria y final de la fase de desaceleración del crecimiento.

En segundo lugar, independientemente de los estadios poblacionales del nematodo en cada instante del cultivo, se han determinado los diferentes parámetros de la biomasa del nematodo (peso seco, CT, COT, CI y NT). En la figura V.3 se pueden ver las relaciones lineales obtenidas al representar dichos parámetros frente al número de nematodos independientemente de los estadios existentes.

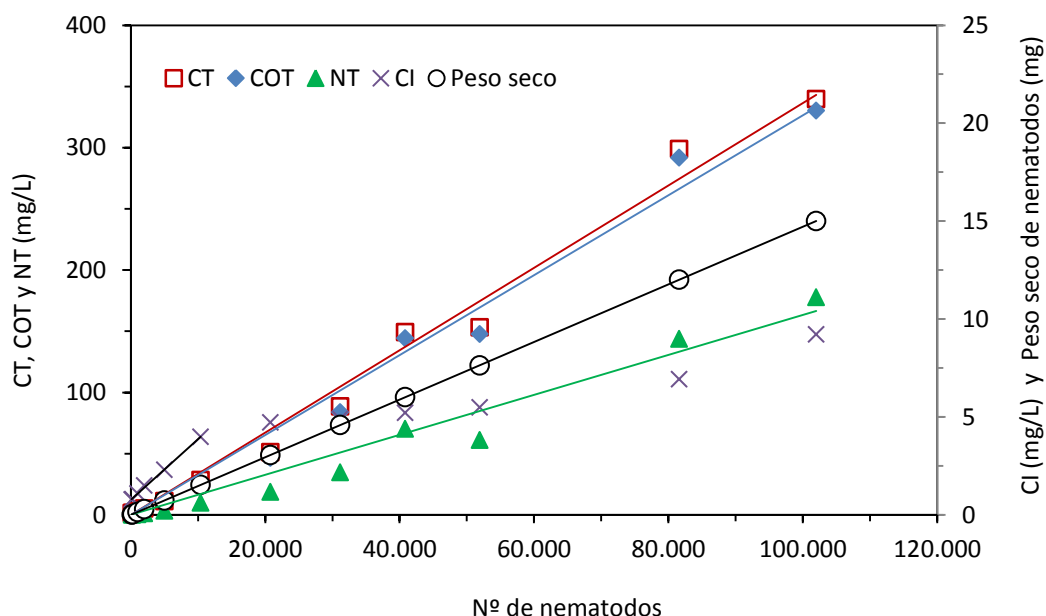


Figura V.3. Variaciones de los parámetros peso seco, CT, COT, CI y NT en función del número de nematodos (cultivos mixtos). Condiciones de operación en matraces en orbital rotatorio: Medio de cultivo = S-Medio con 3% de *E. coli*, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C.

En la tabla V.2 se recogen las ecuaciones determinadas por mínimos cuadrados a partir de los resultados experimentales.

Tabla V.2. Relaciones lineales establecidas entre los parámetros peso seco, CT, COT, CI y NT y el número de nematodos existentes en el medio de cultivo. Rango de 100-100.000 nematodos.

Ecuación	R ²
CT (mg/L) = $3,35 \times 10^{-3} \times (\text{Nº nematodos})$	0,981
COT (mg/L) = $3,25 \times 10^{-3} \times (\text{Nº de nematodos})$	0,978
NT (mg/L) = $1,63 \times 10^{-3} \times \text{Nº de nematodos}$	0,961
CI (mg/L) = $3,09 \times 10^{-4} \times (\text{Nº de nematodos}) + 0,774$	0,993*
Peso seco (mg) = $1,47 \times 10^{-4} \times (\text{Nº de nematodos})$	0,999

*Recta válida hasta 10.000 nematodos

De forma similar a lo anterior, se han determinado las relaciones CT, COT, CI y NT en función del peso seco de los nematodos. La tabla V.3 recoge las ecuaciones obtenidas.

Tabla V.3. Relaciones lineales establecidas entre los parámetros CT, COT, CI y NT y el peso seco de la biomasa de los nematodos. Rango de 0,014-15 mg.

Ecuación	R ²
CT (mg/L) = 22,8 × Peso seco (mg)	0,981
COT (mg/L) = 22,1 × Peso seco (mg)	0,978
NT (mg/L) = 11,1 × Peso seco (mg)	0,961
CI (mg/L) = 2,10 × Peso seco (mg) + 0,774	0,998*

*Recta válida hasta 1,53 mg de nematodos

Para verificar la fiabilidad de las correlaciones obtenidas, se utilizó una muestra problema y se determinó la relación entre su peso seco y el número de nematodos de dos maneras: mediante pesada directa (a) y a partir de la medida del CT aplicando la recta de calibrado (b). El resultado obtenido fue: 31.939 y 30.448±2.542 nematodos/mg, respectivamente. En conclusión, se pueden relacionar de forma indirecta y fiable los valores de los parámetros peso seco, CT, COT y NT mediante del conteo del número de nematodos a partir de pequeñas muestras del cultivo (rango 100-100.000 nematodos) situadas por debajo del límite de detección de técnicas gravimétricas; proponiéndose como una herramienta útil para el seguimiento de la biomasa de *C. elegans* durante su cultivo en medio líquido con independencia de los estadios larvarios.

V.2.2.2. Efecto de la variación del fango durante el año en el crecimiento del nematodo

La figura V.4 muestra las poblaciones finales de *C. elegans* obtenidas al utilizar fango de diferentes fechas a lo largo de cuatro años 2011-2015. Como se puede observar el crecimiento poblacional final de *C. elegans* se encuentra muy influenciado por la fecha del fango utilizado. Sin embargo, no se ha observado esta notable diferencia al trabajar en medio sólido (Figura V.2). Por otra parte, tampoco la composición físico-química del fango muestra gran variación a lo largo del año (Tabla IV.6). Estas diferencias registradas se deben, posiblemente, a la heterogeneidad del fango en otros parámetros como sus características mecánicas (principalmente, el tamaño de las partículas del fango sean superiores al tamaño de la boca del nematodo). Además, de la posible presencia de diferentes compuestos tóxicos (compuestos farmacéuticos, pesticidas, metales pesados, etc.) o bacterias patógenas en mayores o menor concentración en función de la fecha de la toma del fango. Lo que hace de algunos fangos que no sean tan adecuados como medio de cultivo para el crecimiento adecuado del nematodo.

En definitiva, para conocer los motivos exactos de la inhibición del crecimiento del nematodo en algunos fangos, se debe realizar un estudio más exhaustivo a nivel de micro-composición del fango, además de un estudio microbiológico más detallado. De todos modos, como se trata de un trabajo de investigación que pretende proponer un nuevo proceso de reducción y aprovechamiento del fango a nivel industrial, no se ha optado por realizar dicho estudio al ser imposible de aplicar operaciones de separación de dichos inhibidores en las EDARs.

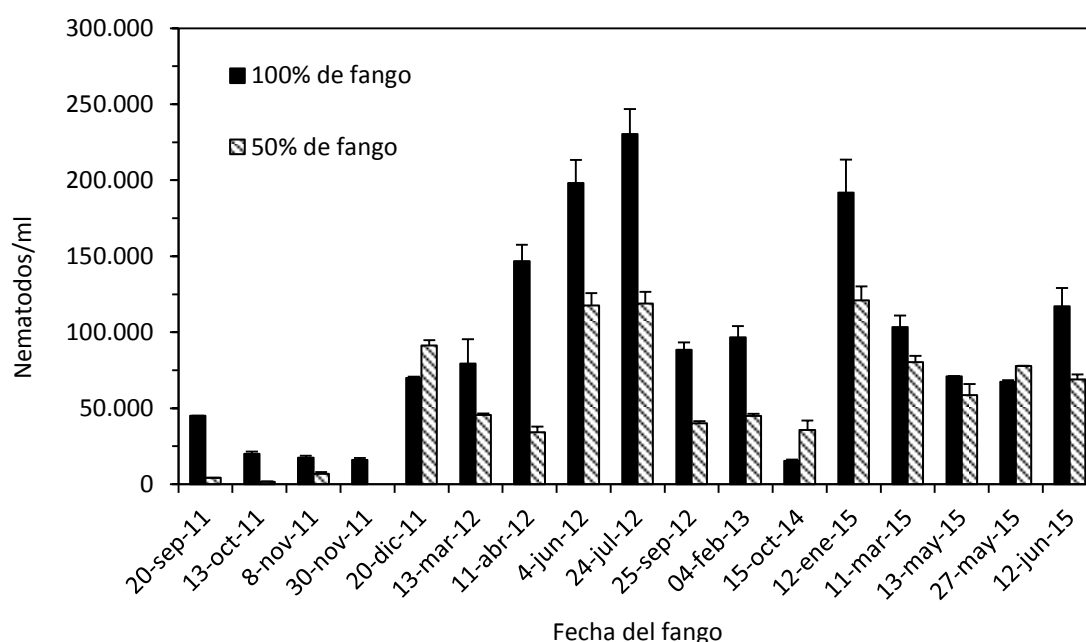


Figura V. 4. Crecimiento máximo de la población de nematodos para fangos de distintas fechas (años 2011 y 2015). El cultivo se ha realizado en matraces de 100 ml con un volumen de 20 ml de fango del espesor secundario. Condiciones de operación: 50 y 100% (v/v) del fango, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar.

V.2.2.3. Influencia de la concentración inicial del fango

La figura V.5 muestra las curvas de crecimiento de las poblaciones de nematodos obtenidas a partir de los medios de cultivos formados por diferentes concentraciones iniciales de fango. Las altas poblaciones de nematodos (31.266 ± 1.534 a 63.460 ± 3.460 nematodos/ml) se han registrados en los medios de cultivos con concentración inicial de fango igual o inferior al 60% (v/v). En todos los experimentos la población máxima de nematodos se ha alcanzado entre las 112 y 120 h de cultivo. En este sentido, la máxima población de nematodos (63.460 ± 3.460 nematodos/ml) se ha determinado en los cultivos con 60% (v/v) de fango. Además, el análisis estadístico,

con un nivel de confianza del 95%, permite postular que el crecimiento poblacional del nematodo no muestra diferencias significativas entre los cultivos con concentraciones de fango del 25% respecto al 50% (v/v). Sin embargo, para cultivos con fango a concentraciones iniciales del 75 y 100% (v/v) se produce un crecimiento claramente inferior y para concentraciones del 35 y 60% (v/v) se incrementa considerablemente la población de nematodos; siendo estas diferencias estadísticamente significativas respecto al 25 y 50% (v/v).

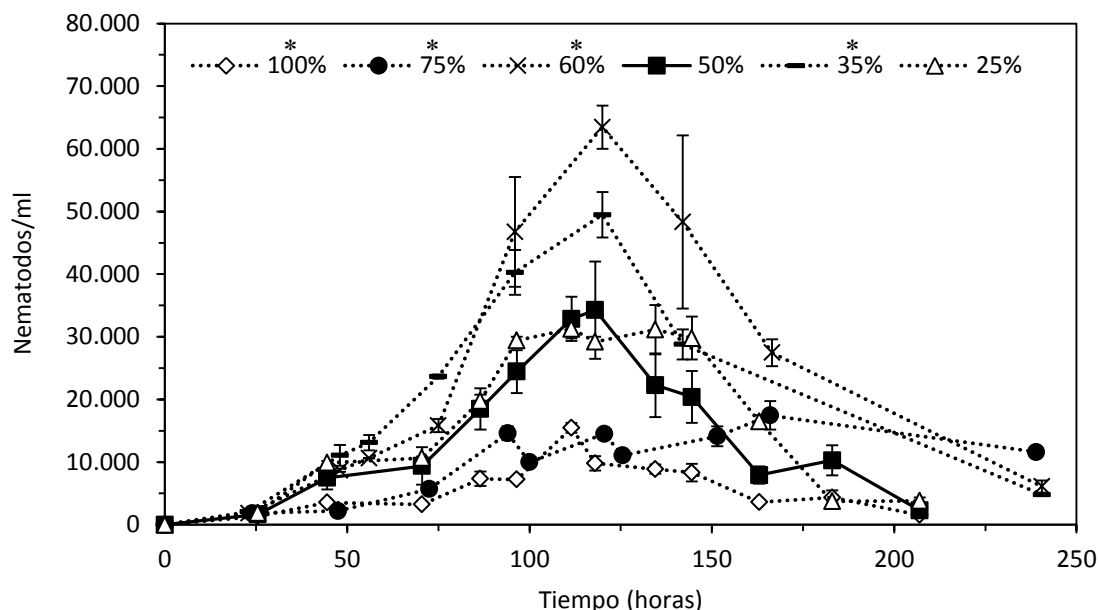


Figura V.5. Crecimiento de la población de nematodos respecto al tiempo para diferentes concentraciones iniciales de fango en el medio de cultivo (% v/v). Condiciones de operación en matraces en orbital rotatorio: pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al fango al 50% (v/v).

El hecho de que a concentraciones del 75 y 100% v/v se obtengan menores crecimientos, puede deberse a la presencia de uno o más nutrientes en el fango con un efecto inhibitorio o tóxico, y que al incrementar la concentración del fango inicial en el medio de cultivo, dichos nutrientes alcancen valores inhibitorios o tóxicos para el crecimiento del nematodo.

Por tanto, para la obtención de una máxima cantidad de biomasa de nematodo en el menor volumen posible, una concentración inicial de fango del 60% (v/v) puede ser la más óptima. Sin embargo, desde el punto de vista de un mayor aprovechamiento y conversión de materia orgánica de fango en nematodo, concentraciones iniciales de fango del 25 y 35% (v/v) presentan un mayor rendimiento.

V.2.2.4. Efecto del almacenamiento del fango

Una peculiaridad que se ha observado durante este trabajo, es que fangos de determinadas fechas como el fango del 30 de noviembre de 2011 o el de 11 de abril de 2012, tras un tiempo de almacenado a 4°C permiten un mayor crecimiento de la población de nematodos en medio líquido (Figura V.6). Por tanto, parece que existen propiedades que varían con el tiempo y tienen una importante influencia en el máximo rendimiento del proceso. Además, esto concuerda con el conocimiento de que el fango es un ecosistema vivo donde se generan cambios poblacionales de las especies presentes que, en última instancia, pueden afectar al crecimiento del nematodo.

De hecho, determinar qué parámetros concretamente están influyendo en estos cambios poblacionales permitiría llevar a cabo tratamientos que aceleren o estabilicen lo que se denomina en este trabajo como “accesibilidad del fango”; ya que por ejemplo, la presencia de agregados bacterianos u organismos filamentosos pueden disminuir la potencialidad nutricional del fango simplemente por una cuestión de inaccesibilidad de la materia orgánica para el tamaño de la boca del nematodo.

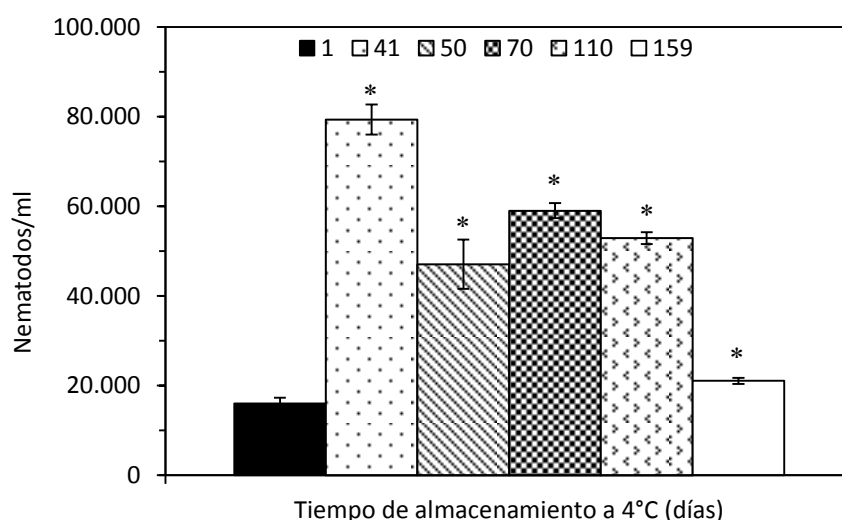


Figura V.6. Crecimiento máximo del nematodo a partir de fango del espesador secundario de fecha 30 de noviembre de 2011 para distinto tiempo de almacenamiento (1, 41, 50, 70, 110 y 159 días) a 4°C. Condiciones de operación en matraces en orbital rotatorio: concentración del fango 100% (v/v), pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al fango con solo un día de almacenamiento.

V.2.2.5. Influencia del inóculo inicial

Mediante la comparación del crecimiento máximo de la población de nematodos aplicando diferentes tamaños de inóculo (Tabla IV.13), se observa que hay un claro aumento al pasar de 100 a 500 nematodos/ml pero no se muestran diferencias significativas entre este último e inóculos superiores (Figura V.7). Por tanto, se deduce que el tamaño de inóculo más adecuado se encuentra entre 100 y 500 nematodos/ml.

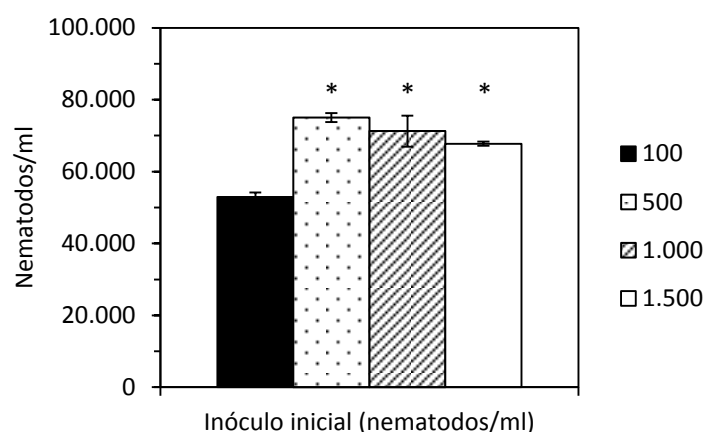


Figura V.7. Crecimiento máximo de un cultivo de nematodos en fango del espesador secundario realizado en medio líquido (matraz). Los inóculos fueron de 100, 500, 1.000 y 1.500 nematodos/ml. La concentración del fango es del 100% v/v. Condiciones de operación: el fango utilizado es de fecha 30-Noviembre, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al inóculo inicial de 100 nematodos/ml.

En trabajos previos con otros depredadores, se ha determinado que la actividad endógena del fango influye en la velocidad de degradación. Esto se debe a que el proceso donde unas bacterias se alimentan de restos de otras bacterias hace que la digestión del fango del oligoqueto tenga que ser más rápida y actuar antes de que se digieran las bacterias entre sí (Buys et al., 2008). Por tanto, en cierta medida la hipótesis planteada se corresponde con estas descripciones.

Tras esta observación, los inóculos iniciales que se utilizaron en experimentos posteriores, tanto en matraces como en biorreactores, fueron de 500 nematodos/ml de forma que los nematodos puedan aprovechar rápidamente la disponibilidad del alimento.

En cuanto a la forma y el momento de inocular los medios de cultivos formados a base de fango (Tabla IV.14). Se observó que cuando se incuban matraces con fango sin inocular en condiciones de agitación y aireación durante cinco o siete días (digestión aerobia) y posteriormente se realiza un inóculo de nematodos, en estos matraces apenas se observa crecimiento de la población de nematodos (Figura V.8). Concretamente, la población no supera los 1.800 nematodos por ml de fango; lo cual es 60 veces menor que el obtenido en matraces inoculados directamente con *C. elegans*. Este hecho se puede explicar considerando que la estructura de la materia orgánica o la distribución del tamaño de partículas del fango se han modificado limitando la accesibilidad del nematodo al fango; de forma que disminuye dicha accesibilidad conforme aumenta el tiempo de operación.

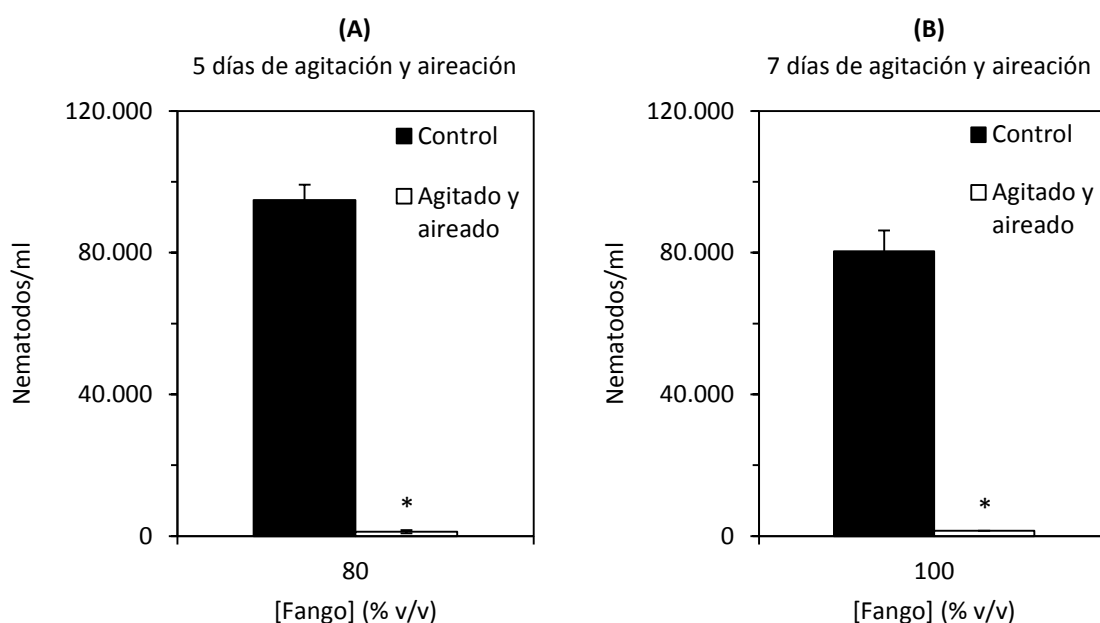


Figura V.8. Crecimiento máximo de la población de nematodos en matraces de orbital rotatorio para dos situaciones: (■) fango inoculado a tiempo cero como control y (□) fango agitado y aireado en matraz e inoculado con nematodos tras 5 y 7 días; correspondiendo a las figuras (A) y (B) respectivamente. Condiciones de operación: fango 13-marzo-2012 (A) y fango 20-diciembre-2011 (B), inóculo inicial de nematodos = 100 nematodos/ml, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control.

V.2.2.6. Reducción de espuma

Los experimentos que han sido realizados en biorreactores presentaron la problemática de generación de espuma debido a la agitación y aireación del biorreactor. La enorme cantidad de espuma formada, llegándose a observar igual volumen de fase gaseosa y fase líquida, ha puesto en evidencia la necesidad de utilizar antiespumantes para controlar la espuma. Los antiespumantes utilizados han sido: “A concentrado” (Sigma Aldrich), 204 (Sigma Aldrich), AFC 5610 (HANSA -CHT R. Beitlich-) y Evescol (Igcar). Posteriormente, se ensayaron medios mecánicos de reducción de espuma.

Independientemente de la eficacia de los antiespumantes en la reducción del volumen de espuma generado, se ha ensayado su efecto sobre el crecimiento del nematodo. En la figura V. 9 se muestra la máxima población de nematodos obtenida en fango, adicionando dichos antiespumantes; para evaluar su posible toxicidad (experimentos realizados en matraces).

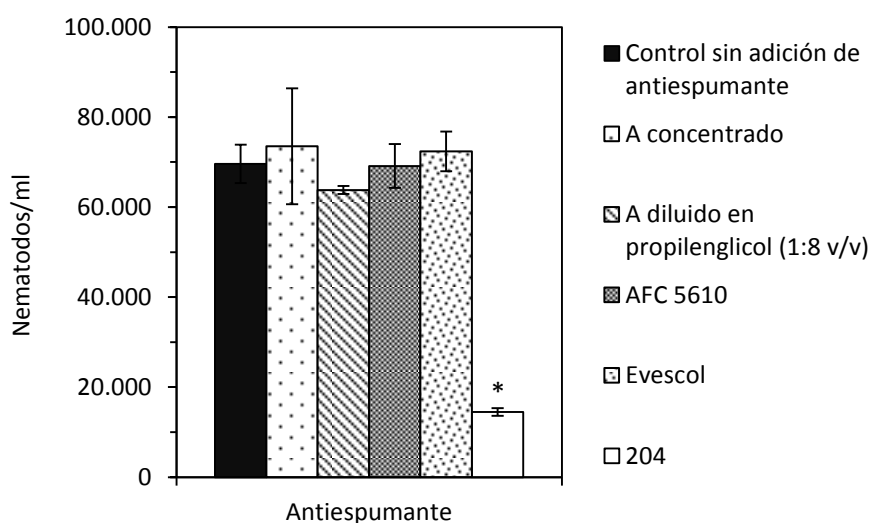


Figura V.9. Crecimiento máximo obtenido de la población de nematodos al utilizar los diferentes antiespumantes comerciales. Condiciones de operación: matraces en orbital rotatorio con fango del 11 de abril y del 4 de junio de 2012, concentración inicial de fango = 50% (v/v), inóculo inicial = 100 nematodos/ml, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control sin adición de antiespumante.

Como se puede observar en la figura V.9 el crecimiento de la población de nematodos se ve drásticamente afectado si se utiliza el antiespumante 204 (14.466 nematodos/ml). Sin embargo, el uso de los antiespumantes A (concentrado y diluido),

Evescol y AFC 5610 permite alcanzar poblaciones de nematodos similares entre sí y sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin adición de antiespumante; registrándose una población media del orden de 67.951 ± 4.972 nematodos/ml. Esta diferencia notable entre el uso del antiespumante 204 y el resto, en relación a la población de nematodos obtenida, puede ser explicada considerando que existe un efecto tóxico debido a uno o más de los componentes del antiespumante 204.

En cuanto a la eficacia de los antiespumantes en la reducción del volumen de espuma generado, los experimentos realizados a nivel de biorreactores mostraron que únicamente el antiespumante AFC 5610 presenta una efectividad elevada; es decir, control total de la espuma (impidiendo la generación de una fase espumosa mayor a 1-2 cm).

Finalmente, para evitar el uso excesivo de antiespumantes químicos, se ha optado por buscar una solución mecánica basada en la roturas de las burbujas generadas. Esta solución se ha alcanzado instalando unas aspas de PVC que giran encima de la superficie del medio de cultivo, de forma que cuando se genera espuma estas aspas actúan rompiendo las burbujas de forma inmediata. Por tanto, en los experimentos con biorreactores se ha utilizado este sistema físico de control de la espuma y se ha adicionado antiespumante AFC 5610 solamente cuando ha sido imprescindible.

V.2.2.7. Reducción de fango

Hasta el momento solo se ha abordado uno de los objetivos de este trabajo: la producción de biomasa de *C. elegans* a partir de fango de EDAR. Por otra parte, la determinación de la reducción del fango como residuo por la actividad del nematodo, ha sido estudiada en mayor profundidad para las series experimentales en biorreactores con mediciones diarias del COT tanto en la fase líquida como en el efluente global. Sin embargo, en matraces se realizaron unos sencillos experimentos para comprobar que la actividad del nematodo contribuye a la eliminación de los sólidos totales. En la tabla IV.16 se puede observar que para cultivos en presencia del nematodo, la reducción es del 10,8% de los ST, mientras que en ausencia del nematodo la reducción se corresponde con un 8,30% de los ST.

La reducción en ausencia de nematodos puede deberse al metabolismo endógeno o la lisis celular que se producen en el propio fango como consecuencia de las condiciones de cultivo: agitación, aireación y temperatura (Khursheed y Kazmi, 2011). Y aunque la contribución del nematodo (respiración) a esta reducción de sólidos totales no presente unos valores muy elevados en los ensayos realizados en matraces, en biorreactores se determinó de manera más clara que la actividad del nematodo proporciona una reducción de la materia orgánica destacable.

Además, en estos experimentos, el propio nematodo está cuantificado como residuo pero su biomasa, o al menos el porcentaje de materia grasa correspondiente, son subproductos de interés cuya recuperación disminuiría el residuo sólido final.

V.2.2.8. Efecto del enriquecimiento de los medios de cultivos

El cultivo de referencia del nematodo *C. elegans* se denomina S-Medio y está constituido por la bacteria *E. coli*, como fuente de carbono, y los siete componentes: NaCl, KH_2PO_4 , colesterol, citrato potásico, trazas de metales, MgSO_4 y CaCl_2 . Normalmente, se obtienen poblaciones similares de nematodos al utilizar la misma concentración inicial de biomasa bacteriana (3% en base húmeda). Sin embargo, cuando el medio de cultivo se forma a partir de fango, el crecimiento máximo poblacional no se mantiene constante aunque la composición físico-química del fango utilizado sea similar, como se ha observado previamente (figura V.4). Esta variación puede ser debida a la complejidad y heterogeneidad del fango en cuanto a los macro y micronutrientes.

La figura V.10 muestra los resultados obtenidos de las poblaciones máximas de *C. elegans* en medios de cultivo formados a base de fangos de diferentes fechas con o sin enriquecimiento en los siete componentes del S-Medio y se observa que el crecimiento de la población de nematodos se ve limitado considerablemente cuando no se enriquece; con la excepción de fangos de dos fechas (8-nov-11 y 30-nov-11) cuyos crecimientos fueron semejantes con o sin adición de estos componentes.

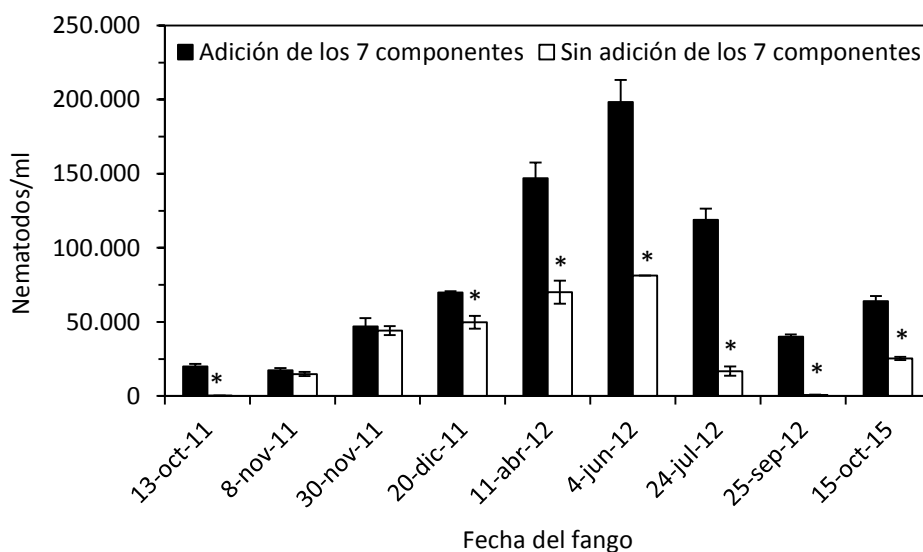


Figura V.10. Crecimiento poblacional máximo de *C. elegans* en fango del espesador secundario con adición o no de los siete componentes del S-Medio. El cultivo se ha realizado en matraces en orbital rotatorio. Condiciones de operación: concentración inicial de fango = 100% v/v, Inóculo inicial = 100 nematodos/ml, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control con la adición de todos los componentes.

Por tanto, se considera que estos componentes tienen algún efecto beneficioso sobre el nematodo, ya sea de manera directa o indirecta al poder modificar la ecología de los microorganismos del propio fango. En consecuencia, se planteó que posiblemente la mayoría de estos componentes no son necesarios al considerar que es probable que el fango ya tenga alguno de los componentes, por lo que se realizaron experimentos para determinar cuáles son imprescindibles para un adecuado crecimiento de la población de nematodos (Tabla IV.18).

Los resultados obtenidos muestran que ningún componente es limitante ya que si se elimina uno solo de ellos, el crecimiento de la población de nematodos es similar al control con todos los componentes (Tabla IV.18). Además, se observa que adicionando de manera independiente uno de los siete componentes, el crecimiento poblacional es inferior en todos los casos, respecto al control con adición de los siete. Sin embargo, se ha detectado que hay tres componentes (NaCl, citrato potásico y KH_2PO_4) que permiten un crecimiento de la población de nematodos próximo al control con la adición de los siete componentes (Figura V.11).

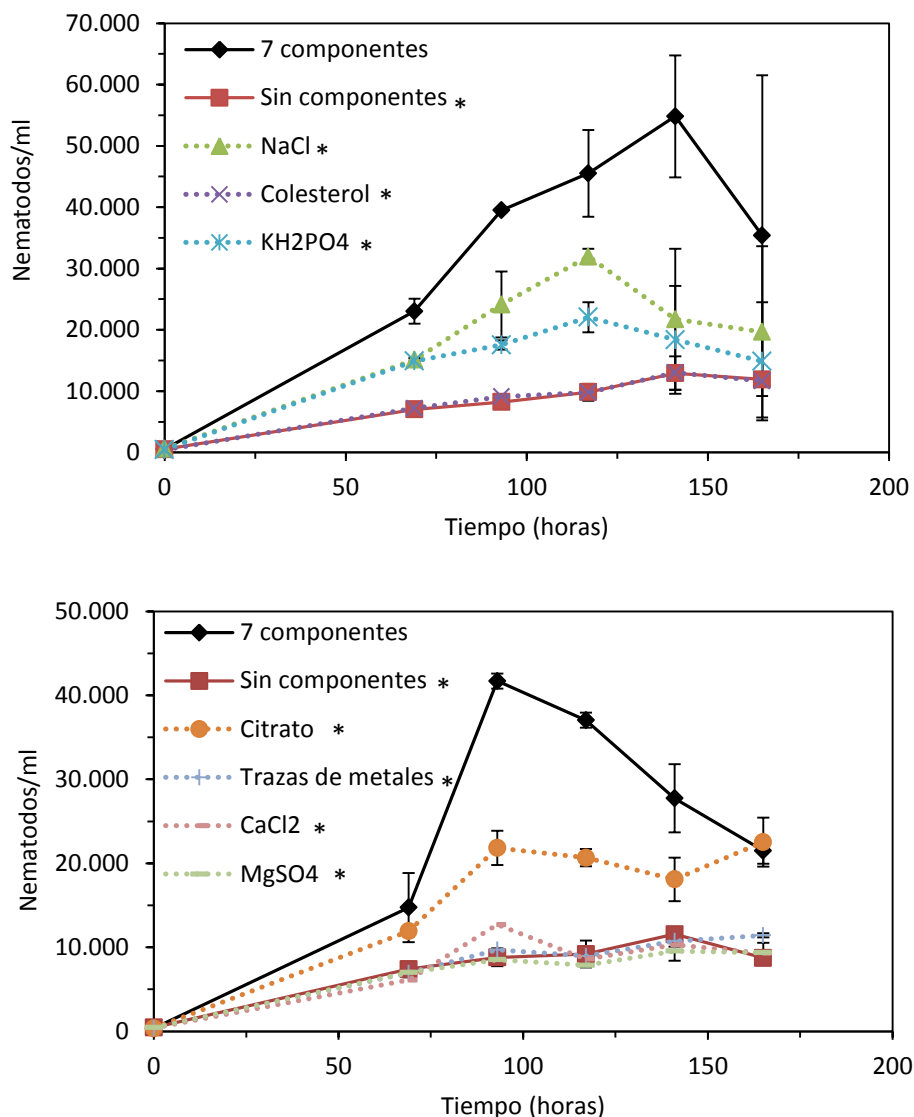


Figura V.11. Crecimiento poblacional de *C. elegans* en fango del espesador secundario adicionando los siete componentes del S-Medio sin adición de ningún componente y con la adición de un componente únicamente. El cultivo se ha realizado en matraces en orbital rotatorio. Condiciones de operación: Fango 15-octubre-2015 al 50% (v/v), Inóculo inicial = 500 nematodos/ml, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control con la adición de todos los componentes.

En vista a lo anterior, se realizaron cultivos con combinaciones de estos tres componentes (NaCl-KH₂PO₄ y NaCl-KH₂PO₄-citrato) y las poblaciones de nematodos finales obtenidas no muestran diferencias significativas respecto a la población final de control con la adición de todos los componentes (Figura 12).

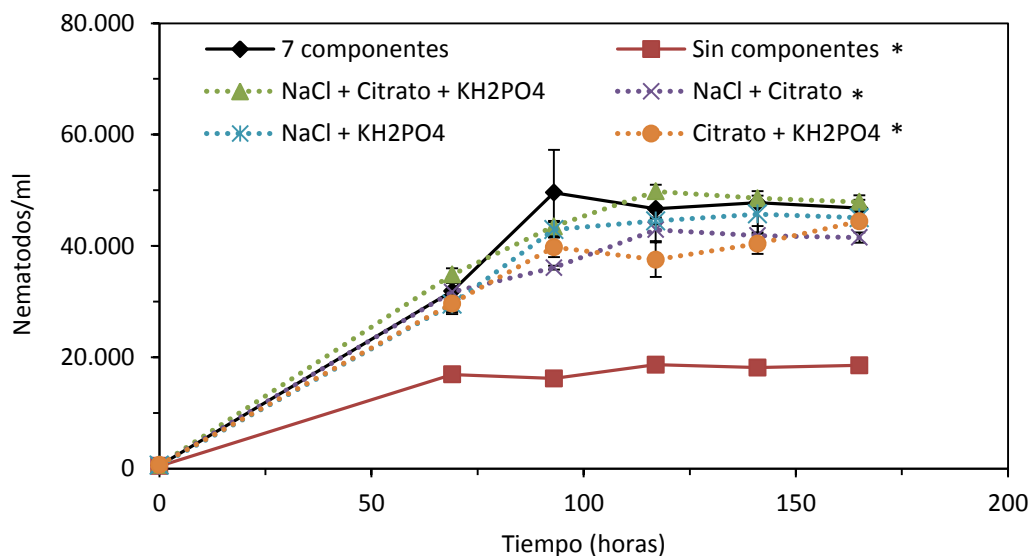


Figura V.12. Crecimiento poblacional de *C. elegans* en fango del espesador secundario. Cultivos adicionando los siete componentes del S-Medio, sin adición de ningún componente y con la adición conjunta de componentes. El cultivo se ha realizado en matraces en orbital rotatorio. Condiciones de operación: Fango 15-octubre-2015 al 50% (v/v), Inóculo inicial = 500 nematodos/ml, pH = sin control, agitación = 170 rpm, aireación = difusión a través del algodón y Temperatura = 20°C. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control con la adición de todos los componentes.

En la figura V.12 se demuestra que la adición de todos los componentes del medio es innecesaria. De hecho, se observa que la adición de fosfato potásico (K_2HPO_4) y de cloruro sódico (NaCl) permite un crecimiento poblacional sin diferencias significativas respecto al control con todos los componentes ($p > 0,05$). Por tanto se puede reducir la adición de componentes de siete a dos sin que se disminuya el crecimiento poblacional del nematodo.

Por otra parte, se desconoce la naturaleza de la influencia de estas sales en el crecimiento de *C. elegans* a partir de fango; el efecto tampón de pH no parece ser la razón por la cual se potencie el crecimiento del nematodo ya que se ha observado que el pH se incrementa bruscamente desde valores de 6-6,5 al inicio del experimento hasta 7-7,5 tras las primeras 24 horas de cultivo con o sin estos tampones.

La posible hipótesis es que estos componentes puedan afectar a la ecología del fango e indirectamente potenciar la presencia de microorganismos más aptos para la alimentación de *C. elegans*. Moussa et al., (2005) han realizado experimentos añadiendo 5 g/L de NaCl al medio para eliminar a los depredadores (protozoos, rotíferos y nematodos). Además, determinaron que dicha concentración de sal no afecta a los oxidadores de amonio y nitrito ni a los heterótrofos. Por otra parte,

observaron que se podía incrementar la actividad nitrificante mediante la supresión del crecimiento de los depredadores (Khursheed y Kazmi, 2011; Moussa et al., 2005). En este trabajo el S-Medio está enriquecido con 0,1 g/L de NaCl que, aunque se encuentra muy por debajo de los 5 g/L, tal vez pueda tener un efecto parcial sobre otros depredadores que compitan con *C. elegans* por los recursos del fango.

En cuanto al fosfato, está descrito como nutriente limitante para el crecimiento de los microorganismos. En general, el fango secundario suele tener algo de fosfato pero está localizado en los microorganismos acumuladores de polifosfatos (Hendrickx et al., 2010b). La adición fosfato de potasio proporciona dicho elemento lo que permitiría el crecimiento de los microorganismos presentes en el fango y, por lo tanto, la alimentación de *C. elegans* en presencia de fosfato. Por otra parte, aunque parece menos probable, no se debe descartar que sea el potasio el elemento de interés; por tanto, pueden realizarse experimentos futuros con distintos tipos de sales para determinar los elementos que realmente influyen en esta mejora del crecimiento de *C. elegans* en fango.

V.2.3. Biorreactores tanque agitado

V.2.3.1. Adaptación y crecimiento del nematodo en Biorreactores

Antes de comenzar a estudiar la influencia de los diferentes parámetros de operación (controlables en la situación actual de las EDARs) en el crecimiento de *C. elegans* y en la reducción final de fango, se han llevado a cabo unos experimentos iniciales con el objetivo de estudiar la capacidad del nematodo de crecer en un biorreactor cerrado y el efecto de ciertas condiciones de operación en su crecimiento; teniendo en cuenta las características mecánicas del nematodo.

En este sentido, se han desarrollado experimentos (Tabla IV.20) donde se ha variado la concentración inicial del fango (25-100%, v/v), la aireación del medio de cultivo (0-5 L/min), la velocidad de agitación (130-900 rpm), configuración del agitador (mosca de agitación, aspas Rushton, aspas hélice, y aspas tipo "U") y antiespumante añadido (A, 204, AFC 5610 y aspas PVC). Se ha observado que se obtiene una población muy limitada en número de nematodos (130-3.500 nematodo/ml) al utilizar moscas de agitación (imanes) y aspas tipo Rushton (110-15.500 nematodo/ml). Sin embargo, el uso de aspas hélice y tipo "U" permite obtener mayor número de nematodos alcanzando 88.700 nematodos/ml en el caso de aspas hélice y 73.400 nematodos/ml utilizando aspas tipo "U". El único inconveniente es la generación de espuma provocado por la aireación mediante burbujeo desde la parte inferior del biorreactor. Este problema se ha podido controlar con el uso de antiespumante AFC 5610 y con las aspas superficiales de PVC.

A la hora de establecer las condiciones de operación iniciales de los experimentos en biorreactores, se ha optado por el uso de las aspas tipo "U" al necesitar velocidades de agitación inferiores (260 rpm) en comparación con las aspas tipo hélice (600-900 rpm) y por lo tanto un menor gasto energético que se refleja en menor coste de operación para escalar el sistema. Además, se ha decidido utilizar aspas superficiales para la reducción de espuma y así disminuir el gasto en consumibles; aunque en ocasiones es necesario complementarlo con la adición de antiespumante AFC 5610.

Por otra parte, cabe mencionar que se ha registrado mayor conversión de materia orgánica de fango en biomasa de nematodo (39,2%) en el caso de operar con las aspas tipo "U" (Tabla IV.20).

V.2.3.2. Cinética del crecimiento de *C. elegans*

En el estudio de los procesos biológicos, la cinética de crecimiento es esencial por su influencia en el diseño de los biorreactores. Cabe destacar que *C. elegans* es un organismo muy utilizado como modelo en estudios de biomedicina, principalmente, respecto al cual existe un creciente número de publicaciones (25.992 según la base de datos "Pubmed", a 3 Julio de 2017). Sin embargo, este trabajo de investigación pretende ser pionero en dos aspectos: i) cultivar el nematodo *C. elegans* en biorreactores cerrados y determinar su cinética de crecimiento, ii) la utilización de fango de depuradoras como medio de cultivo eliminando parcialmente dicho residuo.

Cabe señalar que no existe información sobre la cinética de crecimiento de *C. elegans*. Aunque sí hay antecedentes de estudios cinéticos de otros nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (utilizados en el control biológico de insectos), éstos ensayos se han realizado en pequeños reactores de 50 ml de volumen (De la Torre, 2003). Los resultados experimentales, han mostrado que la curva de crecimiento de *C. elegans* puede describirse con las mismas fases de crecimiento que los microorganismos (fase Lag, fase exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria y fase de muerte). A partir de dichos resultados experimentales se han determinado los siguientes parámetros de crecimiento del nematodo: velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m), productividad en la biomasa de nematodo (P) y velocidad específica máxima de muerte (μ_d); determinadas a lo largo de la fase exponencial, desaceleración y de muerte, respectivamente.

Los estudios específicos de cinética del crecimiento del nematodo y degradación del fango se describirán y discutirán detalladamente a partir de los resultados obtenidos en tres series específicas de parámetros de operación: concentración inicial del fango (A), velocidad de suministro de aire (B) y velocidad de agitación mecánica (C).

A) Efecto de la concentración inicial del fango

La concentración de sustrato (fango del espesador secundario) es uno de los parámetros más influyentes en el crecimiento de la población de nematodos; como se ha descrito en este trabajo para el cultivo en matraces de orbital rotatorio. En esta serie experimental, se han realizado experimentos con diferentes concentraciones iniciales de fango (diluciones fango-agua, % v/v) manteniendo constantes los parámetros de temperatura (20°C), caudal de aireación (2 L/min) y velocidad de agitación mecánica (260 rpm) con aspa tipo “U”.

La figura V.13 muestra las curvas de crecimiento de *C. elegans* en las coordenadas logarítmica y normal de la población de nematodos frente al tiempo. A partir de la determinación de cada una de las fases del cultivo, se calculan las velocidades específicas máximas de crecimiento (μ_m) y de muerte (μ_d); además de la productividad en biomasa de nematodo (P). También se muestra la duración de cada una de las fases mediante el uso de una línea de tendencia sólida.

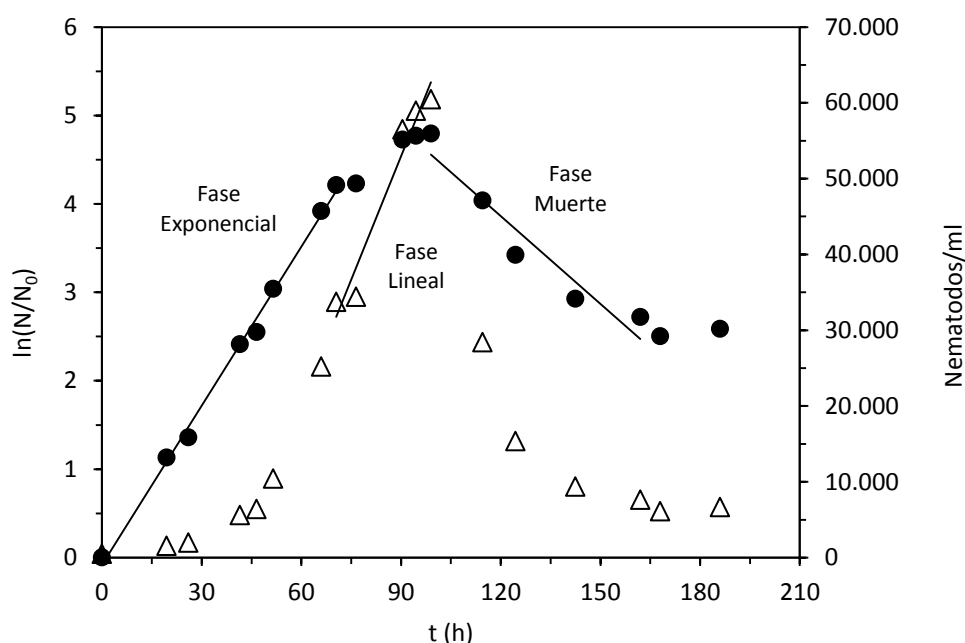


Figura V.13. Crecimiento de la población de nematodos respecto al tiempo en base logarítmica (●) y en número de nematodos por ml (Δ). Se observan en el gráfico la fase exponencial, la fase de desaceleración (lineal) y la fase de muerte de la población de nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 50 % (v/v), pH = sin ajustar, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

La tabla V.4 recoge los valores obtenidos de las velocidades específicas máximas de crecimiento y de muerte y la productividad en biomasa. En la figura V.14, se observa que la velocidad específica máxima de crecimiento aumenta con el incremento de la concentración de fango para luego disminuir a partir del 25 % (v/v) de concentración inicial de fango. La productividad en biomasa se incrementa al aumentar la concentración de fango de 0 a 60% (v/v) para luego disminuir. La velocidad específica de muerte tiene signo negativo y se incrementa, en valor absoluto, conforme se aumenta la concentración inicial de fango; siendo mínima al 25% (v/v) (Figura V.14).

Tabla V.4. Parámetros cinéticos de crecimiento de *C. elegans* determinados para diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

[Sustrato] (% v/v)	μ_m (h ⁻¹)	R ²	P (Nem ml ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	μ_d (h ⁻¹)	R ²
10	0,0576	0,983	-	-	-	-
25	0,0827	0,986	-	-	-0,0245	0,997
35	0,0658	0,993	447	0,980	-0,0235	0,995
50	0,0600	0,996	1.086	0,953	-0,0331	0,917
60	0,0595	0,986	1.924	0,976	-0,0320	0,908
75	0,0397	0,990	373	0,927	-0,0391	0,984
100	0,0262	0,984	-	-	-0,0212	0,913

Los valores de las velocidades específicas máximas de crecimiento se han ajustado al modelo de Tessier (Tessier, 1942) según la ecuación V.1 y los parámetros característicos se recogen en la tabla V.5.

$$\mu_m = \mu \cdot \left(e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s} \right) \quad (\text{Ec. V.1})$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹)

S = concentración de sustrato que limita el crecimiento (% v/v)

K_s = constante de saturación (% v/v)

K_i = constante de inhibición (% v/v)

Tabla V.5. Parámetros característicos del modelo matemático de Tessier obtenidos a partir del ajuste por regresión no lineal de los resultados experimentales utilizando el Programa OriginPro 8.0.

$\mu_{m, \text{máx}}$ (h^{-1})	K_i (% v/v)	K_s (% v/v)	R^2	SSQ
0,121	71,9	8,42	0,966	$1,17 \times 10^{-4}$

En la figura V.14 se observa que la μ_m registra sus valores más altos de $0,079 \text{ h}^{-1}$ a $0,0484 \text{ h}^{-1}$ entre el 25 % y el 60% de la concentración inicial del fango en el medio de cultivo, respectivamente. Por otra parte, los valores obtenidos por el modelo de Tessier de K_i (72 %, v/v), siendo muy superior al valor de K_s (8,42 %, v/v), son consistentes con lo observado experimentalmente.

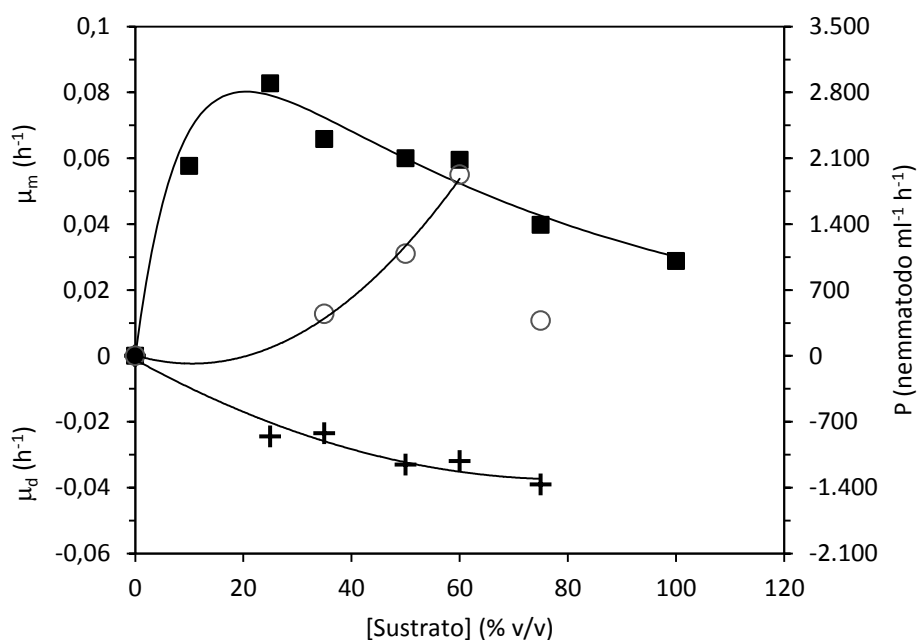


Figura V.14. Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m (\square), Productividad en biomasa P (\circ) y velocidad específica máxima de muerte μ_d ($+$) frente a distintas concentraciones iniciales de sustrato (fango). Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = \text{variable (\%, v/v)}$, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

La productividad en la biomasa del nematodo (P) aumenta con el incremento de la concentración inicial del fango en el medio de cultivo hasta una concentración igual al 60% de fango para luego disminuir de forma drástica. Los datos experimentales de la productividad en biomasa obtenidos en el rango 0-60% (v/v) de fango se han podido ajustar a un modelo matemático de segundo orden:

$$P = 0,801 \times [\text{Sustrato}]^2 - 16,8 \times [\text{Sustrato}] + 5,93 \quad (R^2 = 0,995) \quad (\text{Ec. V.2})$$

En cuanto a la velocidad específica máxima de muerte (μ_d) se ha observado que aumenta en valor absoluto con el incremento de la concentración inicial del fango en el medio de cultivo. Los datos experimentales de la velocidad específica de muerte se han podido ajustar a un modelo matemático de segundo orden:

$$\mu_d = 5,63 \times 10^{-6} \times [\text{Sustrato}]^2 - 9,05 \times 10^{-4} \times [\text{Sustrato}] - 1,15 \times 10^{-3} \quad (R^2 = 0,959) \quad (\text{Ec. V.3})$$

En vista de los resultados experimentales que se muestran en la figura V.14 se puede concluir que existe un rango de concentraciones iniciales de sustrato donde se registraron mayores velocidades específicas de crecimiento, mayor productividad y menor velocidad de muerte para el cultivo de *C. elegans* a partir de fango. Dicho rango oscila entre el 25% y el 60% (v/v) de fango en el medio de cultivo. Por lo anterior, en este trabajo de investigación se ha optado por la concentración inicial de fango del 25% (v/v) como la más adecuada atendiendo a criterios de cinética del cultivo; ya que permite una mayor velocidad de crecimiento (μ_m) de la población de nematodos.

B) Influencia de la velocidad de suministro de aire

El nematodo *C. elegans* es un organismo aerobio, por lo que la presencia de oxígeno es indispensable para su viabilidad y crecimiento. La concentración de oxígeno disuelto para un caudal de 2 L/min, ha registrado valores de 7 mg/L de oxígeno; los cuales son próximos a los que se describen para agua en saturación a 20°C (8,84 mg/L) (Bain y Stevenson, 1999). Por tanto, cabe esperar que caudales en torno a 2 L/min no limitarán el crecimiento de *C. elegans* por anaerobiosis.

Por otra parte, la aireación tiene una doble función en el cultivo: proporcionar un medio aerobio y agitar el medio mediante burbujeo. En esta serie experimental, se han realizado ensayos con diferentes caudales de aireación (L/min) manteniendo constantes los parámetros de concentración inicial de fango (25% v/v), temperatura (20°C) y velocidad de agitación mecánica (260 rpm) con aspa tipo "U".

La figura V.15 muestra el cálculo de los parámetros cinéticos relacionados con la biomasa de nematodo. A partir de la determinación de cada una de las fases de crecimiento se calcularon las velocidades específicas máximas de crecimiento y de muerte, además de la productividad en biomasa. En general, la duración de la fase exponencial de crecimiento del nematodo, en esta serie experimental, ha sido del orden de 70 horas.

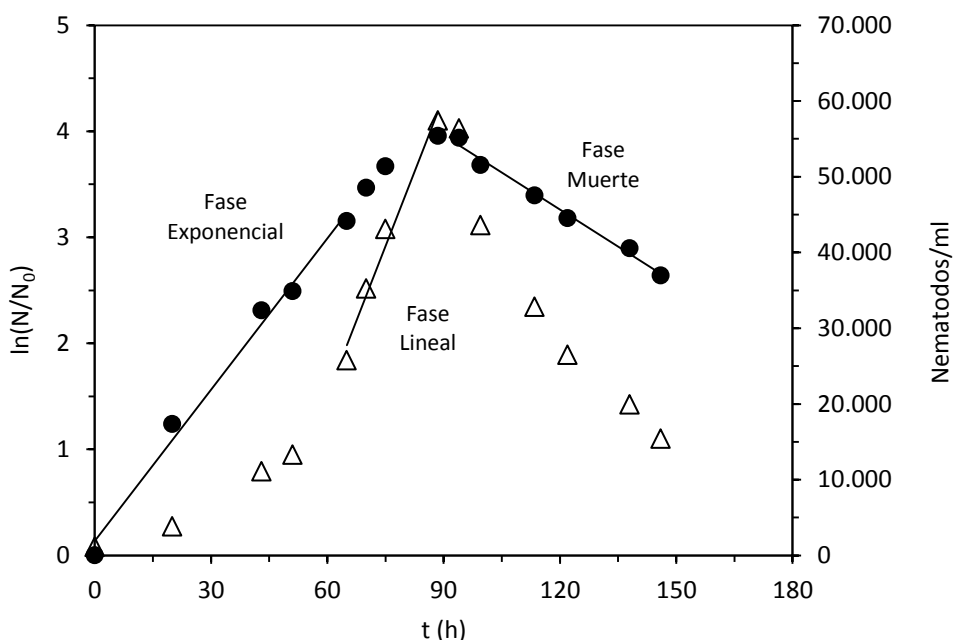


Figura V.15. Crecimiento de la población de nematodos respecto al tiempo en base logarítmica (●) y en número de nematodos por ml (Δ). Se muestran en el gráfico la fase exponencial, la fase de desaceleración (lineal) y la fase de muerte de la población de nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = 25 % (v/v), pH = sin ajustar, aireación = 3 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

La tabla V.6 muestra los valores numéricos de los diferentes parámetros cinéticos determinados a partir de los datos experimentales de los diferentes experimentos de la serie de aireación.

Tabla V.6. Parámetros cinéticos de crecimiento de *C. elegans* determinados para diferentes caudales de suministro de aire.

Q (L/min)	μ_m (h ⁻¹)	R ²	P (Nem ml ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	μ_d (h ⁻¹)	R ²
0	0,00419	0,999	-	-	-0,0397	0,997
0,5	0,0380	0,999	-	-	-0,0326	0,993
1	0,0455	0,985	-	-	-0,0272	0,987
1,5	0,0492	0,992	18	0,999	-0,0233	0,999
2	0,0546	0,999	564	0,982	-0,0177	0,993
3	0,0476	0,989	1.310	0,943	-0,0233	0,989

En la figura V.16 se muestra de forma gráfica la variación de los distintos parámetros cinéticos en función de la velocidad de suministro de aire. En dicha gráfica se observa que μ_m se incrementa en un orden de magnitud cuando se aumenta el caudal de aire de 0 a 0,5 L/min siendo estas velocidades de 0,00419 y 0,0380 h⁻¹, respectivamente. A partir de 0,5 L/min, se incrementa ligeramente la μ_m alcanzando su máximo en 0,0546 h⁻¹ para el caudal de 2 L/min (Tabla V.6). Es importante señalar que la ausencia de aireación, prácticamente no permite la viabilidad de la población de nematodos. Los valores de las velocidades específicas de crecimiento y de muerte se han ajustado por regresiones no lineales al modelo cinético de Monod (Monod, 1949) adaptado para la variable “velocidad de suministro de aire” (Ec. V.4) utilizando el programa OriginPro 8.0.

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Ec. V.4})$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹)

S = velocidad de suministro de aire que limita el crecimiento (L/min)

K_s = constante de saturación de la velocidad de suministro de aire limitante (L/min)

Por otra parte, no se han detectado fases de desaceleración en los medios de cultivos con una velocidad de suministro de aire inferior a $1,5 \text{ L min}^{-1}$. Mientras que a partir de un caudal de aire de $1,5 \text{ L min}^{-1}$ la productividad en biomasa de nematodo ha mostrado una tendencia lineal (Figura V.16).

En la tabla V.7 se muestran los valores numéricos de los diferentes parámetros calculados del modelo de Monod (Monod, 1949) para las velocidades específicas de crecimiento y muerte.

En cuanto a la velocidad específica máxima de muerte ($\mu_{d,m\acute{a}x}$), la población de nematodos muere a mayor velocidad cuanto menor es la aireación de entrada. Siendo de $-0,0397$ y $-0,0196 \text{ h}^{-1}$ para 0 y 2 L/min respectivamente; observándose una analogía con $\mu_{m,m\acute{a}x}$.

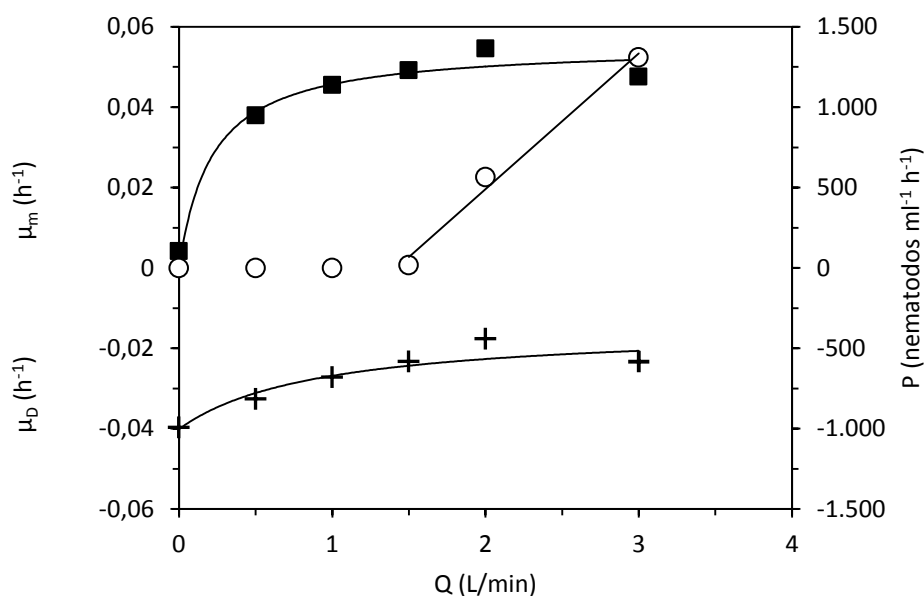


Figura V.16. Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m (\square) y velocidad específica máxima de muerte μ_d ($+$) frente a distintos caudales de aireación. También se muestra la productividad en nematodos $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (\circ) frente a diferentes caudales de aireación. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25\% \text{ (v/v)}$, aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

Tabla V.7. Parámetros cinéticos del modelo de Monod (Monod, 1949) para las velocidades específicas de crecimiento y muerte de *C. elegans*.

Fase	$\mu_{m, \text{máx}} / \mu_{d, \text{máx}}$ (h ⁻¹)	k_s (L/min)	Constante (h ⁻¹)	R ²	SSQ
Exponencial	0,0555	0,214	-	0,958	5,64×10 ⁻⁵
Muerte	-0,0254	0,915	-0,0401	0,877	2,01×10 ⁻⁵

Por otra parte, la productividad en la biomasa del nematodo (P) no se aprecia hasta que los caudales de suministro de aire son superiores a 1,5 L min⁻¹ (Figura V.16). A partir de este caudal de suministro de aire, la productividad en biomasa registra un incremento lineal con el aumento de la aireación del medio de cultivo, siguiendo un ajuste de regresión lineal cuya pendiente es de 845 (nem min ml⁻¹ h⁻¹ L⁻¹, R² = 0,990).

Finalmente, cabe destacar que un caudal de suministro de aire de 2 L/min permite un crecimiento más rápido de la población. Sin embargo, las diferencias respecto a 0,5 L/min no son excesivas y esta reducción de caudal podría disminuir los costes de operación de una manera considerable. De hecho, Low y Chase (1999) estiman que el coste de la aireación constituye el 50% del total del coste energético del proceso de depuración (Khursheed y Kazmi 2011; Low y Chase 1999a; Low y Chase 1999b). Por lo tanto, habría que realizar un balance económico para evaluar si es más rentable un crecimiento a máxima velocidad de la población de nematodos o un caudal de aireación 4 veces menor. En base a lo anterior, se ha optado en este trabajo de investigación por considerar un caudal de aire de 1 L/min que constituye un compromiso intermedio entre una elevada velocidad de crecimiento de la población de nematodos y un menor coste energético debido a la aireación.

C) Efecto de la velocidad de agitación mecánica

Los experimentos llevados a cabo en esta serie, se han realizado variando la velocidad de agitación mecánica (rpm) con aspa tipo “U”, manteniendo constantes los parámetros de concentración inicial de fango (25% v/v), caudal de aireación (1L/min) y temperatura (20°C).

En la figura V.17 se observa un ejemplo de la determinación de las fases de crecimiento y el cálculo de los parámetros cinéticos correspondientes: las velocidades específicas máximas de crecimiento y de muerte y la productividad en la biomasa del nematodo. En los experimentos de esta serie experimental no se han detectado fases Lag y el crecimiento del nematodo comienza directamente con la fase exponencial.

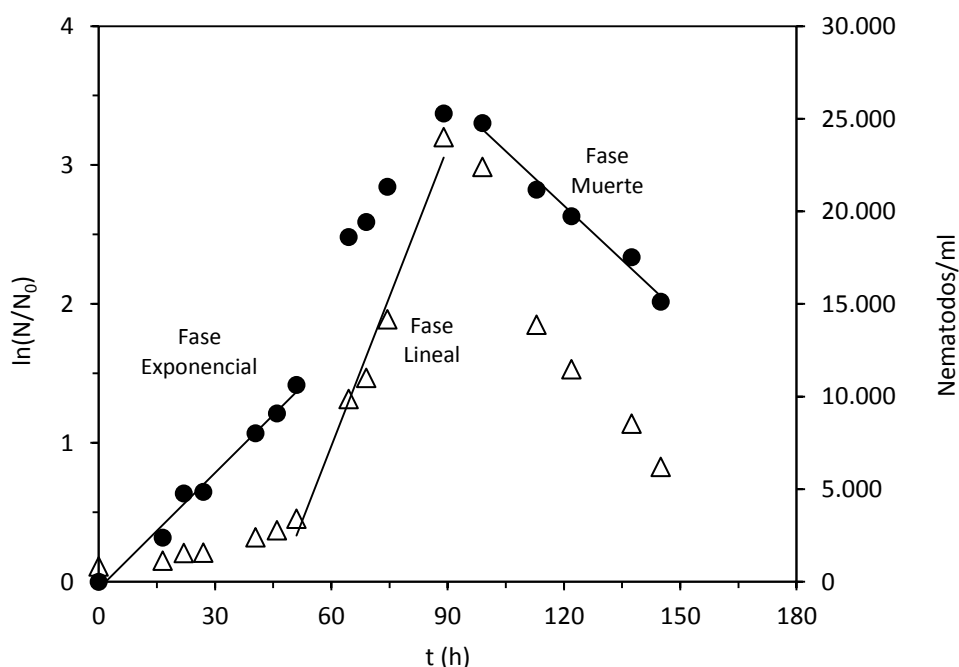


Figura V.17. Crecimiento de la población de nematodos respecto al tiempo en base logarítmica (●) y en número de nematodos por ml (Δ). Se observan en el gráfico la fase exponencial, la fase de desaceleración (lineal) y la fase de muerte de la población de nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = 25 % (v/v), pH = sin ajustar, aireación = 1 L/min, agitación = 80 rpm y T = 20°C.

Los valores numéricos de los parámetros cinéticos calculados se pueden ver en la tabla V.8. Se observa que la μ_m aumenta conforme se incrementa la velocidad de agitación mecánica; de hecho, esta subida se produce más drásticamente en el rango de 0 a 100 rpm cuyos valores de μ_m son de 0,0105 y 0,0311 h⁻¹, respectivamente; es decir, se triplica el valor de μ_m . A partir de 100 rpm, continúa la tendencia positiva pero

más ligeramente hasta 400 rpm (límite superior experimentado). En cuanto a la productividad en biomasa no muestra variación apreciable al incrementar la velocidad de agitación de 0 a 225 rpm. A partir de 225 rpm la productividad en biomasa muestra una tendencia decreciente notable. Sin embargo, la velocidad específica máxima de muerte disminuye, en valor absoluto, al incrementar la agitación de 0 a 100 rpm para luego establecerse y mantenerse prácticamente constante hasta el final del rango de velocidades de agitación estudiado (Tabla V.8).

Tabla V.8. Parámetros cinéticos de crecimiento de *C. elegans* determinados para diferentes velocidades de agitación mecánica.

Agitación (rpm)	μ_m (h ⁻¹)	R ²	P (Nem ml ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	μ_d (h ⁻¹)	R ²
0	0,0105	0,991	405	0,991	-0,0331	0,991
40	0,0237	0,992	457	0,994	-0,0262	0,990
80	0,0278	0,986	448	0,993	-0,0261	0,983
100	0,0311	0,989	444	0,999	-0,0257	0,972
220	0,0372	0,998	440	0,989	-0,0224	0,984
300	0,0413	0,993	271	0,800	-0,0255	0,920
400	0,0440	0,998	188	0,981	-0,0225	0,999

Los parámetros cinéticos calculados permiten identificar la influencia de la velocidad de agitación mecánica (Figura V.18). La variación de las velocidades específicas máximas de crecimiento y de muerte se ha ajustado al modelo de Monod (Monod, 1949) adaptado para la variable “velocidad de agitación mecánica” (Ec. V.5) por regresiones no lineales utilizando el Programa OriginPro 8.0. Según el modelo, las velocidades específicas máximas de crecimiento, $\mu_{m, \max}$, y de muerte, $\mu_{d, \max}$, tienen un valor de 0,0414 h⁻¹ y -0,0102 h⁻¹, respectivamente (Tabla V.9).

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Ec. V.5})$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹)

S = velocidad de agitación mecánica que limita el crecimiento (rpm)

K_s = constante de saturación de la velocidad de agitación mecánica limitante (rpm)

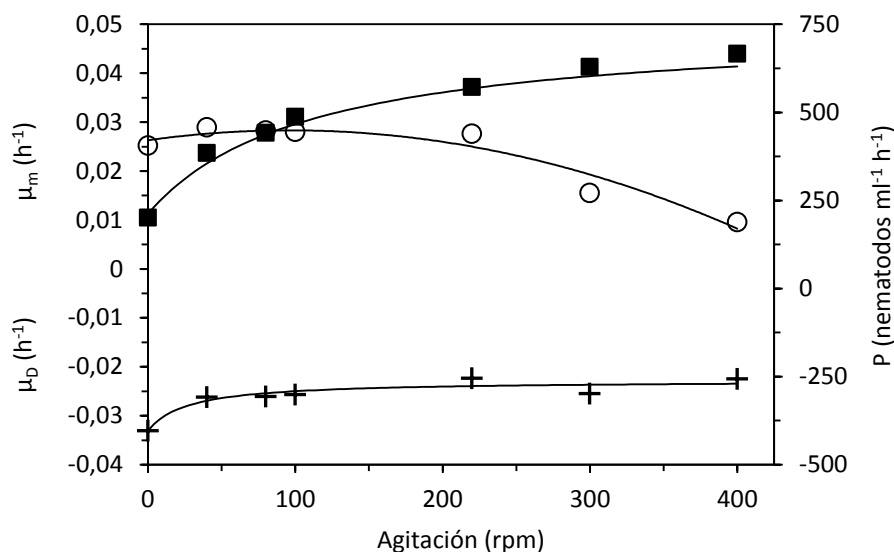


Figura V.18. Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m (□) y velocidad específica máxima de muerte μ_d (+) frente a distintas velocidades de agitación mecánica. También se muestra la productividad en nematodos $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (o) frente a diferentes velocidades de agitación. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25\%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

Tabla V.9. Parámetros cinéticos obtenido del modelo de Monod (Monod, 1949) a las distintas velocidades de agitación mecánica frente a las velocidades de crecimiento y muerte de *C. elegans*.

Fase	$\mu_m, \text{máx}/ \mu_d, \text{máx}$ (h ⁻¹)	k_s (rpm)	Constante (h ⁻¹)	R^2	SSQ
Exponencial	0,0414	108	0,0108	0,989	$6,93 \times 10^{-6}$
Muerte	-0,0102	26,9	-0,0331	0,836	$8,36 \times 10^{-6}$

Sin embargo, la productividad en biomasa se mantiene constante al incrementar la velocidad de agitación de 0 a 220 rpm, permitiendo considerar un valor medio de 438,8 nematodos $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$. A partir de 220 rpm la productividad en biomasa muestra una tendencia decreciente (Figura V.18). Por otra parte, se han ajustado los valores de la productividad en biomasa a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$P = 3,02 \times 10^{-3} \times (\text{Vel. Agit.})^2 + 5,82 \times 10^{-1} \times (\text{Vel. Agit.}) + 4,21 \times 10^{-2} \quad (R^2 = 0,925) \quad (\text{Ec. V.6})$$

A partir de los resultados anteriormente mencionados se puede concluir que la velocidad de agitación óptima se encuentra en el rango de 80 a 220 rpm donde mayor ha sido la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad en biomasa.

V.2.3.3. Degradación del fango

En este proyecto de investigación destacan dos objetivos generales: producción de biomasa de nematodo y reducción del volumen de fango generado.

En cuanto a la producción de biomasa de *C. elegans*, los estudios de cinética del nematodo han permitido determinar qué parámetros de operación son los más adecuados para un mayor crecimiento de la población de este nematodo. Sin embargo, la reducción de fango es fundamental para que el proceso sea integrado y aporte una solución a la problemática existente en las EDARs debido a los enormes volúmenes de fango y el coste económico y ambiental asociado a su eliminación.

En consecuencia, para las tres series de parámetros de operación, se han estudiado las variaciones de los contenidos en carbono (CT, COT, CI) y en nitrógeno (NT, NKT y NN) diariamente durante cada experimento, además se han determinado los sólidos totales, la materia orgánica, la demanda química de oxígeno, el pH y la conductividad eléctrica. Esto permite calcular a su vez el porcentaje de reducción de fango que se obtiene debido al crecimiento del nematodo y su actividad depredadora.

La imposibilidad de separar los nematodos de la biomasa del fango para estudiar la degradación del fango ha obligado a distinguir entre tres fracciones o fases: 1) Efluente global (fango, nematodos y agua tratada), 2) Agua tratada (sobrenadante tras centrifugación) y 3) Biomasa (fango + nematodos). Este último ha sido calculado a partir de la diferencia entre los contenidos de los diferentes parámetros del efluente global menos los del sobrenadante (Figura V.19).

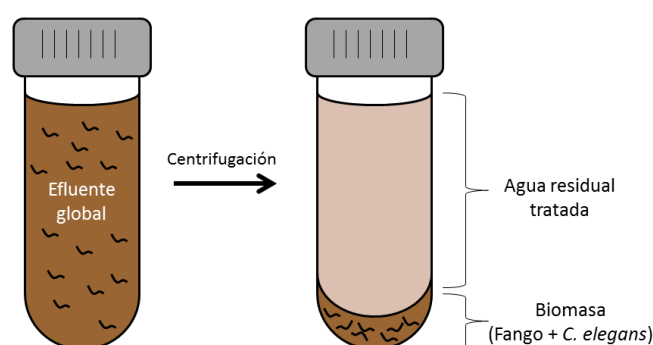


Figura V.19. Ilustración de las distintas fases estudiadas para determinar la degradación del fango: efluente global (sin separación de las fases), biomasa (fango más nematodos) y sobrenadante (agua residual tratada) obtenido mediante centrifugación.

A) Efecto de la concentración inicial del fango

En este trabajo se ha descrito previamente que la concentración inicial de fango influye considerablemente en la cinética de crecimiento de la población de nematodos; lo cual también se observó en cultivos realizados en matraces en orbital rotatorio. Sin embargo, como el sustrato es el propio fango del espesador secundario, es necesario determinar igualmente si las mejores concentraciones para el crecimiento de la población de *C. elegans*, se corresponden con las mayores reducciones de fango y mejor calidad del agua residual después del tratamiento con nematodos.

Las figuras V.20 y V.21 muestran los perfiles de los contenidos en CT, COT, CI, NT y NN a lo largo de los experimentos que utilizan como sustrato fango al 25 % (v/v) en ausencia y en presencia de nematodos, respectivamente.

Como se puede observar en la figura V.20.A en la fracción global del efluente se detecta la reducción en los contenidos de CT y COT debido al consumo de nutrientes del efluente por la actividad microbiana. Sin embargo, se observa un ligero incremento del contenido en NT y en CI. Este hecho es consecuencia probablemente de la fijación del nitrógeno atmosférico suministrado por la aireación a nitrógeno orgánico por parte de algunos microorganismos como por ejemplo *Azotobacter*, *Clostridium*, y algas verde azuladas (Follett, 2001). En cuanto al ligero aumento de CI se debe a la solubilidad del CO₂ atmosférico y la formación del ácido carbónico y sus aniones, bicarbonato y carbonato, donde la cantidad y proporción de estas especies depende del pH existente en el medio de cultivo. De hecho en la tabla IV.21 se observa un ligero incremento del pH del cultivo lo que podría deberse a la actividad de las posibles microalgas que constituyen parte del fango; éstas consumirían el CO₂ incorporado al medio de cultivo provocando la subida del pH y originando la precipitación de CaCO₃ (Stumm y Morgan, 1981; Chojnacka y Marquéz-Rocha, 2004).

En la misma figura mencionada anteriormente (Figura V.20.B) se puede observar que en la fracción del agua tratada (separada por centrifugación) los valores de los contenidos en CT y COT muestran una caída notable del 56% para ambos que se debe como es natural a la eliminación de nutrientes (principalmente materia orgánica) del medio de cultivo debido a la actividad microbiana. Por otra parte, se registra un ligero incremento en el contenido en NT debido a la nitrificación del medio (proceso aerobio) pudiendo considerar un valor medio de NT = 219±31 mg/L. En este sentido cabe indicar que la aparición de NO₃+NO₂ a los 92h de cultivo (Tabla IV.24) confirma la existencia del proceso de nitrificación (Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015). En cuanto al contenido en CI no se aprecia un cambio notable pudiendo considerar un valor medio de CI = 17±4 mg/L.

En la figura V.20.C correspondiente a la biomasa del fango (experimento control sin nematodos) se observa claramente la generación de biomasa microbiana

que se confirma con el incremento de todos los valores de los contenidos en CT, COT, CI y NT (Rodríguez-Pérez y Feroso, 2016; Amanatidou et al., 2015).

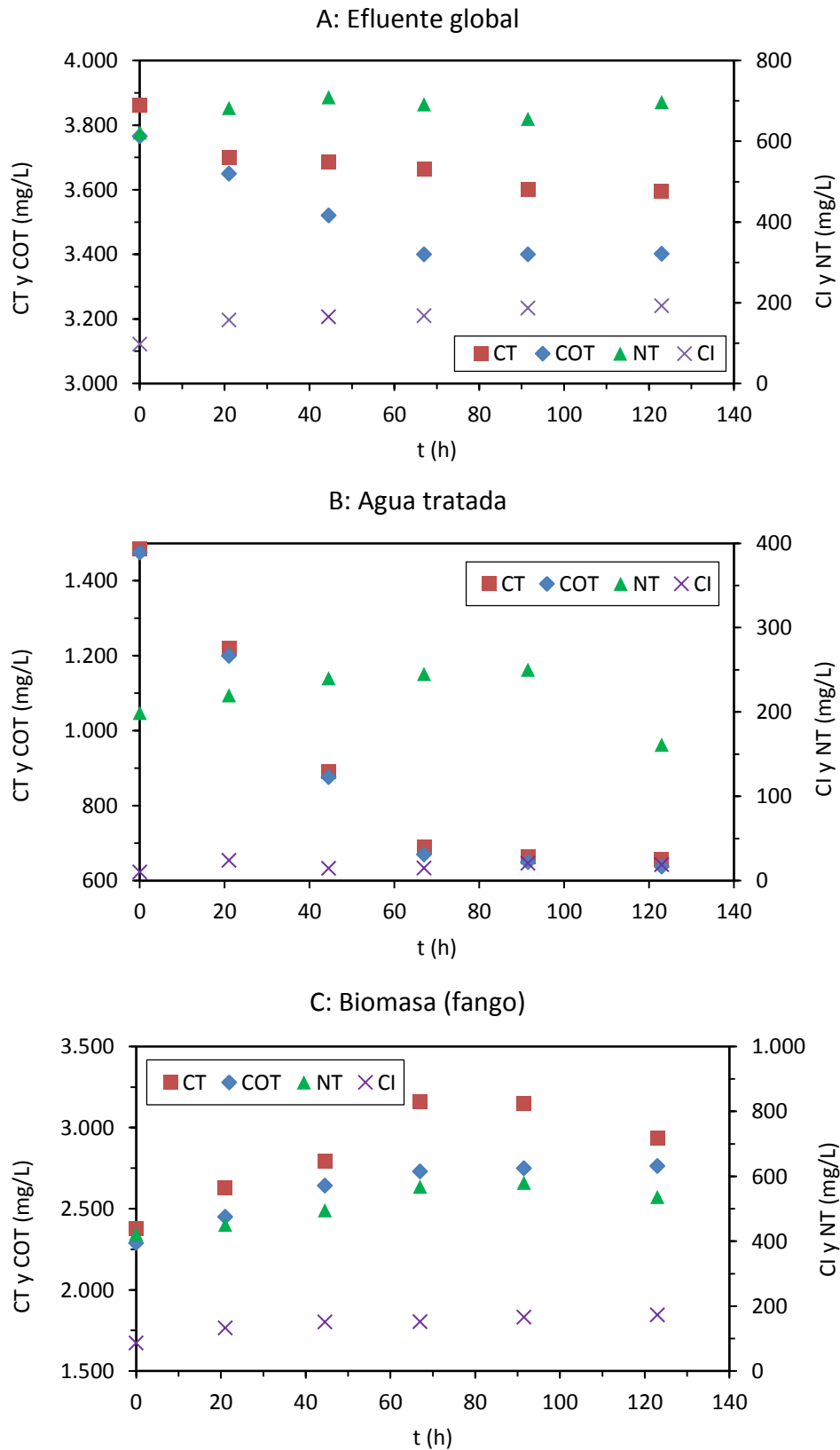


Figura V.20. Variación de los contenidos en CT, COT, CI, y NT durante el cultivo del fango (sin nematodos) en condiciones aerobias. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

En la figura IV.21 se observa el comportamiento de los contenidos en CT, COT, CI, TN y NO_2+NO_3 durante el experimento en presencia del nematodo *C. elegans* con una concentración inicial de fango del 25% (v/v).

Al realizar la comparación entre los experimentos sin y con nematodos se observa que la tendencia de los diferentes perfiles de CT, COT, CI y NT es similar en las fracciones del efluente global (Figura IV.21.A) y el agua tratada (Figura IV.21.B). Aunque los porcentajes de reducciones al final de los experimentos de los contenidos en CT y COT en el efluente global son superiores en presencia de nematodos 46,3% y 42,5%, respectivamente, que en el caso del control (sin nematodos) 9,7% y 7%, respectivamente.

En cuanto al contenido en CI se han registrado los porcentajes -97,6% y -106,3% en el experimento sin y con nematodos respectivamente. En cuanto al contenido en nitrógeno en ambos experimentos, se observa que el incremento en el NT es inferior en el experimento con nematodos (-7,5 %) frente al -12,2% en el cultivo de control sin nematodos. El aumento del grado de mineralización de la biomasa global se debe a la degradación de la biomasa del fango por parte del nematodo. También cabe resaltar que la relación CT/NT en el cultivo de control ha variado a lo largo del experimento entre 5,1 y 6,2 frente a una variación entre 3,3 y 4,7 en presencia del nematodo.

Observaciones similares se han registrado en la fracción del agua tratada entre el cultivo de control sin nematodos (Figura V.20.B) y el cultivo con presencia de nematodos (Figura V.21.B). Pero la calidad final del agua es superior en el caso de aplicar el cultivo de *C. elegans*. En este sentido, se han registrado los siguientes valores en el cultivo de control (sin nematodo): CT = 55,8%, COT = 56,8%, CI = -82,6% y NT = 19,0% frente a los siguientes valores en el cultivo que cuenta con la presencia del nematodo: CT = 86,2%, COT = 86,3%, CI = 70,9% y NT = -22,5%. Se observa el incremento del grado de degradación debido a la actividad del nematodo, incluso, se detecta la retirada positiva de carbono inorgánico (CI 70,9 %). Sin embargo, se registra al final de los cultivos un incremento del nitrógeno que se puede deber a la muerte pronunciada de los nematodos después de 80h de cultivo lo que da lugar a una nitrificación al existir condiciones favorables debido a un contenido en COT bajo igual a 195 mg/L y una buena oxigenación del cultivo de 2 L/min. Otra hipótesis es que se produzca acumulación de NH_3 y NH_4^+ , desechos del metabolismo del nitrógeno de *C. elegans* (Rothstein, 1963; Rothstein, 1965; Rothstein y Mayoh, 1965). A su vez, la actividad nitrificante se puede confirmar debido a la detección temprana de altas concentraciones de NO_3+NO_2 igual a 10,3 mg/L a las 72h y 57,8 mg/L al final del cultivo; mientras que en el experimento control se detectan a las 92h (en la fracción líquida) con una concentración media de 7,31 mg/L hasta el final del experimento (Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015).

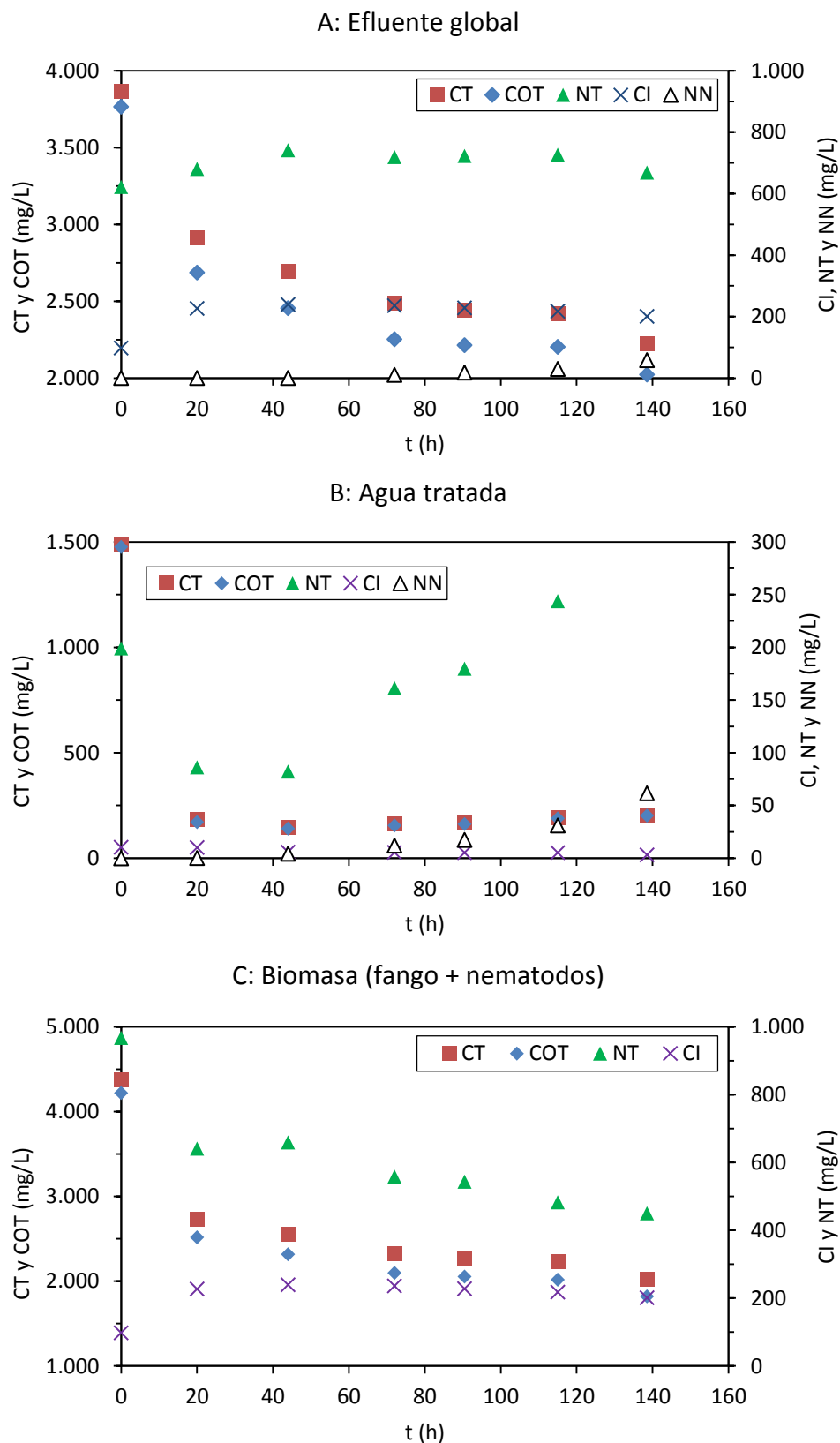


Figura V.21. Variación de los contenidos en CT, COT, CI, NT y NN durante el cultivo del fango con nematodos en condiciones aerobias. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

En cuanto a la fracción de biomasa global en presencia de nematodos (Figura V.21.C) se observan unas tendencias inversas a las registradas en el experimento de control (Figura V.20.C). En lugar de existir un crecimiento de biomasa del fango, como en el experimento de control, en presencia de *C. elegans* se registra reducción en los parámetros CT, COT y NT confirmando la reducción de la biomasa del fango como consecuencia de la depredación del nematodo. Los porcentajes de eliminación registrados han sido CT = 53,8%, COT = 56,8% y NT = 53,5%. Además, se observa un incremento en el grado de mineralización de la biomasa (CI = -27,7%). Cabe destacar que en el caso del experimento de control todos los parámetros de la biomasa han registrado porcentajes eliminación negativos, es decir, generación de: CT = -23,6%, COT = -20,7%, CI = -99,4% y NT = -26,8%.

Cinética de la degradación del fango

Con el objetivo de describir la cinética química de los resultados experimentales obtenidos, se ha tratado de determinar el orden de reacción que gobierne la degradación del fango. En este sentido, se ha probado el ajuste de los datos experimentales a ecuaciones de diferentes órdenes de reacción, durante la dos primeras fases de crecimiento (Lag y exponencial), determinando que la degradación de fango mediante el cultivo del nematodo *C. elegans* puede seguir orden uno y/o dos pero en el caso del orden uno no se obtenía un buen ajuste matemático en todas las series experimentales. Por ello, se ha optado por elegir el ajuste a ecuación de segundo orden.

A.1 Efluente global

En la figura V.22 se puede ver la representación gráfica (a base del contenido en COT) correspondiente a una reacción de segundo orden y los ajustes obtenidos durante las fases Lag (en caso de existencia) y exponencial del crecimiento del nematodo *C. elegans*.

En la tabla V.10 se recogen las constantes de reacción determinadas en función del contenido en COT, NT y NO_3+NO_2 . Además, de los porcentajes de eliminación obtenidos al final de los experimentos.

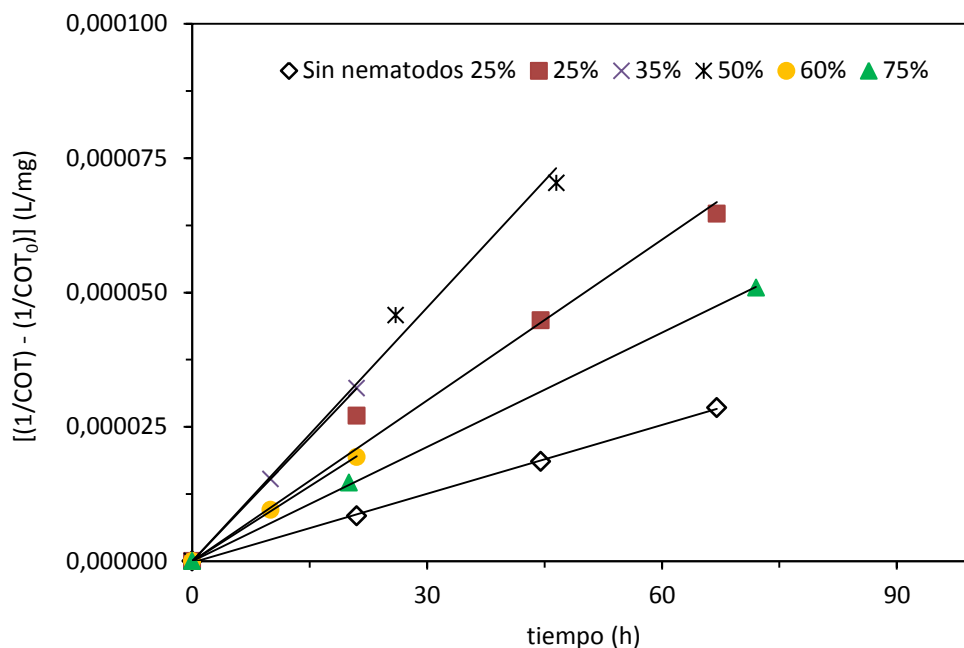


Figura V. 22. Representación gráfica, a diferentes concentraciones iniciales de fango, del ajuste matemático a una ecuación de reacción de segundo orden (en base al COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global a distintas concentraciones de sustrato. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

Tabla V.10. Constantes de reacción (en base a COT, NT y NO₃+NO₂) durante la fase exponencial del crecimiento del nematodo y porcentajes de eliminación del fango al final de cada experimento. Datos para el efluente global a distintas concentraciones iniciales de sustrato (fango).

Efluente global								
[Sustrato] (% v/v)	$K_{COT, EG} \times 10^7$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	COT _{eliminado} (%)	$K_{NT, EG} \times 10^6$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	NT _{eliminado} (%)	* $K_{NN, EG}$ (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	R ²
25 SIN Nematodos	4,22	0,999	9,65	-4,88	0,902	-12,2	-	-
25	9,98	0,981	13,7	-5,22	0,995	-12,0	1,73	0,989
35	15,3	0,999	17,0	-0,867	0,999	5,08	2,20	0,999
50	15,2	0,989	38,6	-0,672	0,978	15,4	2,30	0,984
60	9,29	0,999	27,2	0,405	0,998	6,6	2,48	0,982
75	4,10	0,999	-4,30	1,11	0,752	20,0	2,90	0,992

* K_{NN} = Constante calculado para una ecuación de orden cero.

Como se puede ver en la figura V.23, las constantes de degradación del fango en base al contenido en COT, en todos los experimentos han sido superiores en el caso de emplear el nematodo *C. elegans* en los cultivos frente al control sin nematodos, registrando un valor máximo de $K_{COT, EG} = 15,3 \times 10^{-7} \text{ L mg}^{-1}\text{h}^{-1}$. De la misma manera, en

la figura V.24 se muestra la variación de los porcentajes de eliminación del contenido en COT, donde se observa que aumenta con el incremento de la concentración inicial de fango en los cultivos y en presencia de nematodos hasta su valor máximo (38,6 %) en los cultivos con una concentración de fango del 50% (v/v). Una vez alcanzado el porcentaje máximo de eliminación (en base al COT), al seguir incrementando la concentración del fango en el medio de cultivo, el porcentaje de COT eliminado disminuye de forma pronunciada registrando un valor negativo indicando un incremento en el contenido de fango (COT ↑) en los cultivos al 75 % (v/v).

Este hecho se puede justificar considerando que el crecimiento del nematodo en los cultivos con una concentración de fango del 75% (v/v) es menor, lo que implica un crecimiento del fango (digestión aerobia) e incluso existe la posibilidad de que se produzca fijación de CO₂ mediante microalgas.

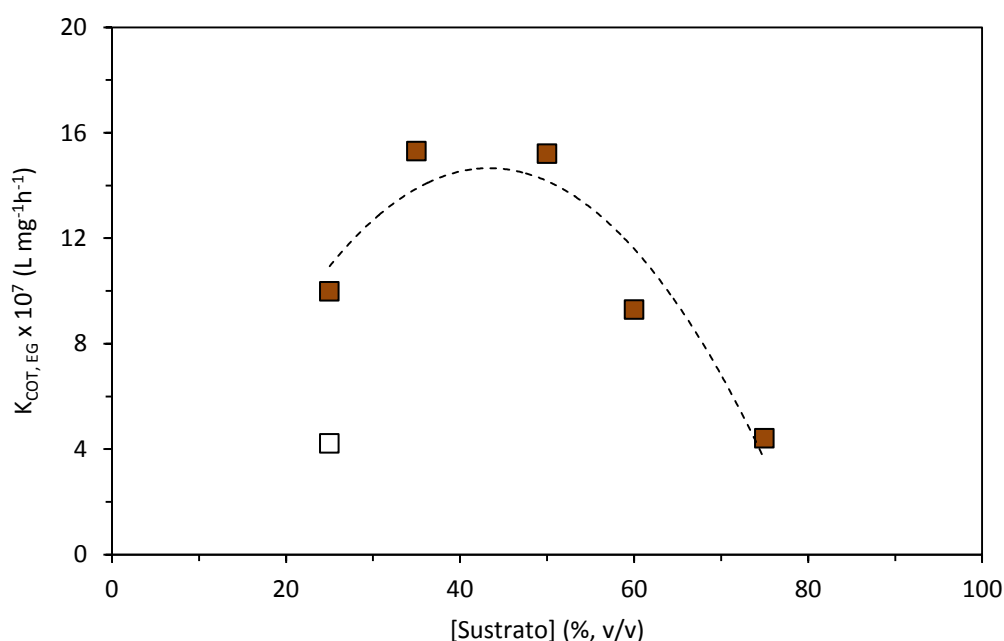


Figura V. 23. Constantes de degradación a base del contenido en COT en el efluente global ($K_{COT, EG}$) para diferentes concentraciones de sustrato (fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

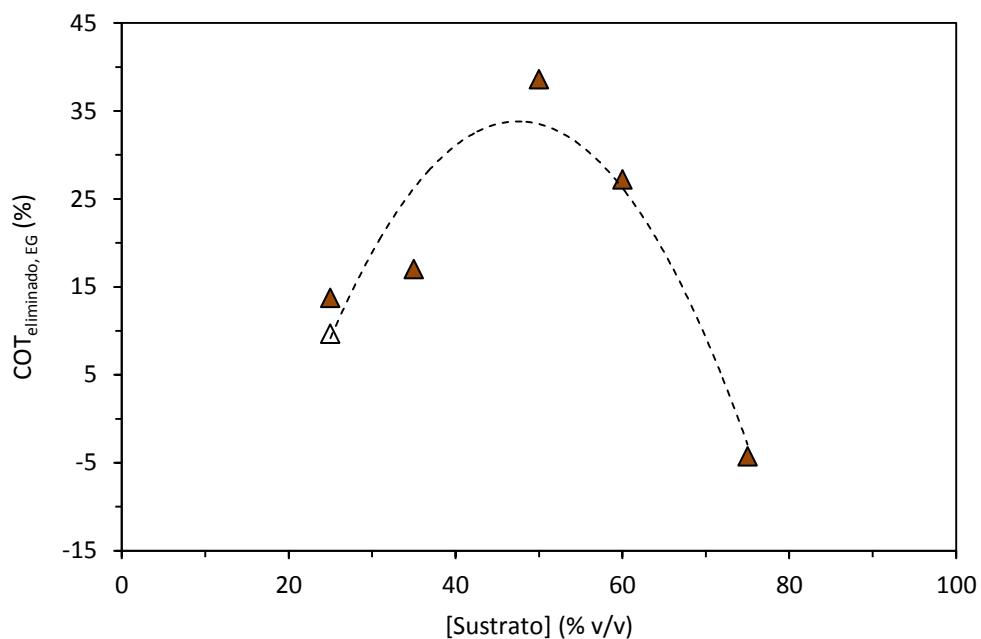


Figura V.24. Porcentaje de degradación en base al contenido en COT en el efluente global para diferentes concentraciones de sustrato (fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = \text{variable (\%, v/v)}$, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

La figura V.25 muestra la representación gráfica del ajuste matemático a una ecuación de reacción de segundo orden del contenido en nitrógeno total (NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo.

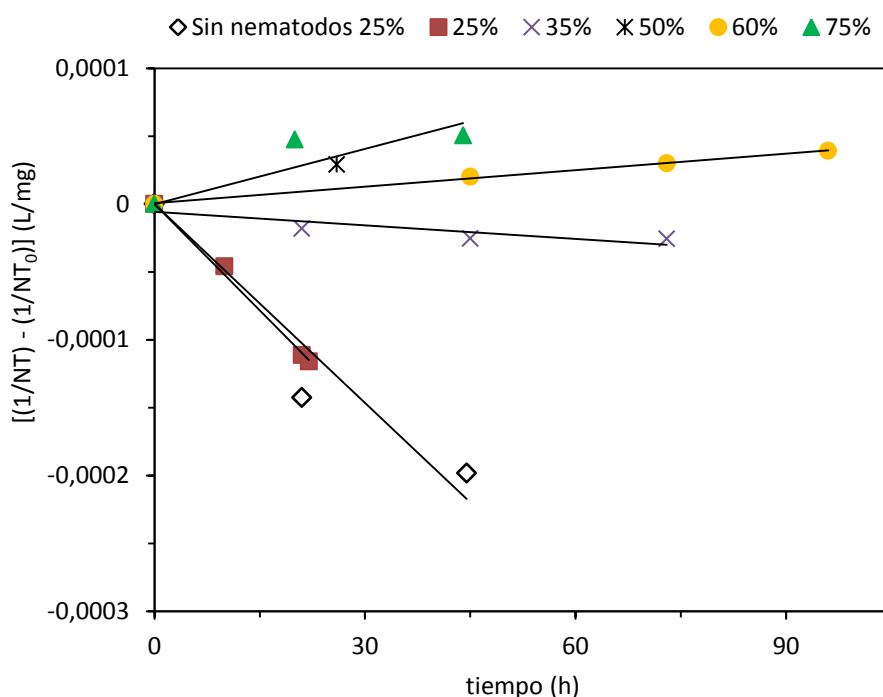


Figura V. 25. Representación gráfica, a diferentes diluciones del fango, del ajuste matemático a una ecuación de reacción de segundo orden (en base a NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global a distintas concentraciones de sustrato. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

La tabla V.10 recoge las constantes, en base al contenido en nitrógeno total de la ecuación de reacción de segundo orden, calculados. Como se puede ver no existen diferencias significativas entre las constantes calculadas en los cultivos al 25 % (v/v) de fango con o sin nematodos (Figura V.26). En la figura V.26 no se aprecia una degradación de proteínas (NT) en los cultivos para concentraciones de fango inferiores al 50 % (v/v), de hecho en el cultivo con el 60% (v/v) de fango se observa una caída en el contenido de nitrógeno en las primeras 123 h correspondientes al crecimiento exponencial del nematodo; después, se observa un incremento de NT en paralelo a la caída la población de nematodos (Tabla IV.43).

En la figura V.27 se muestran los porcentajes de eliminación de nitrógeno globales obtenidos entre el inicio y final del experimento. Se confirma lo observado anteriormente, que la eliminación del contenido en nitrógeno solo se registra en concentraciones de fango iniciales superiores al 35 % (v/v) lo que implica que el balance entre la actividad del nematodo y la actividad microbiana del fango es negativa respecto al contenido en nitrógeno en los cultivos con una concentración inferior al 50 % (v/v).

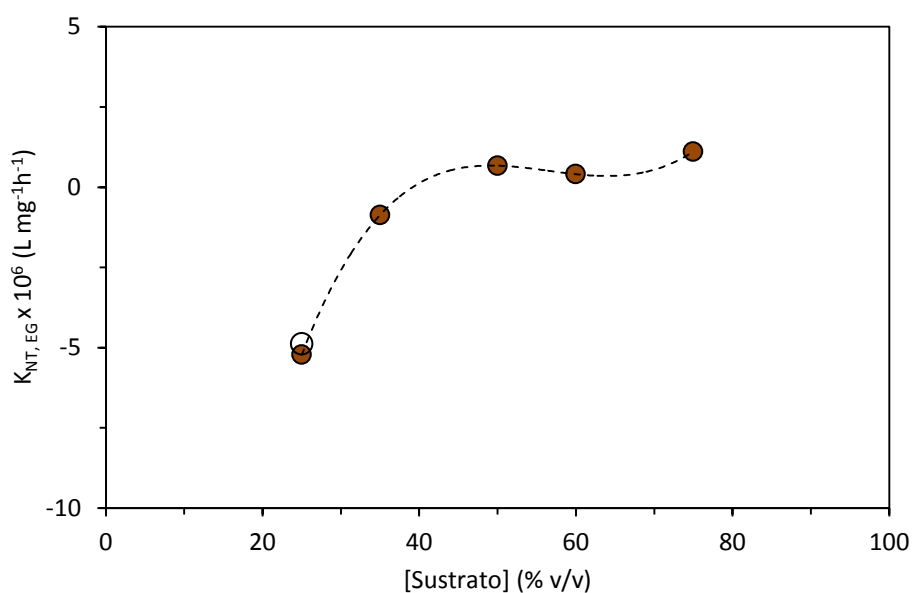


Figura V. 26. Constantes de degradación a base del contenido en NT en el efluente global ($K_{NT,EG}$) para diferentes concentraciones de sustrato (Fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = \text{variable (\%, v/v)}$, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

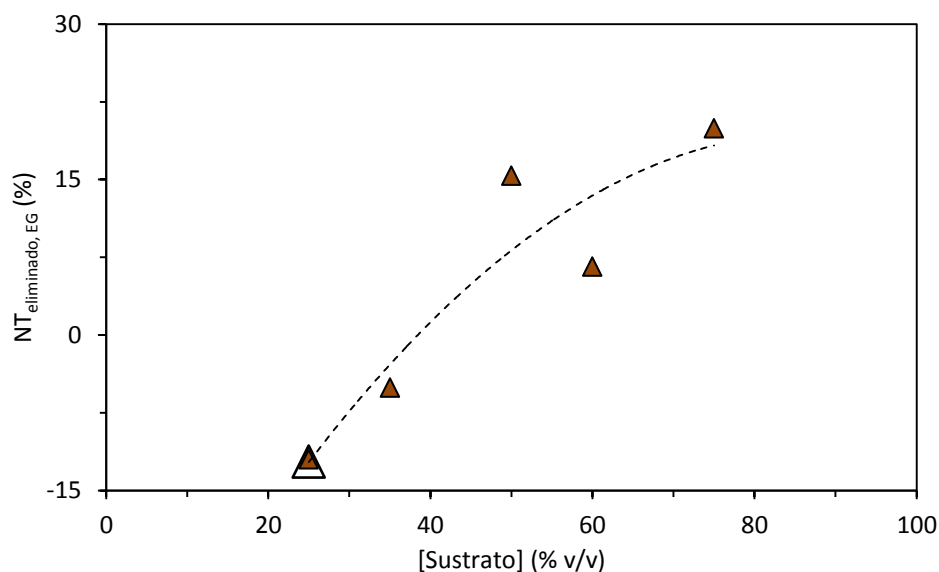


Figura V. 27. Porcentaje de eliminación a base del contenido en NT en el efluente global para diferentes concentraciones de sustrato (fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = \text{variable (\%, v/v)}$, aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

La detección de los $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ no se ha registrado en el cultivo al 25% (v/v) de fango sin nematodo. Sin embargo, en todos los cultivos realizados a diferentes concentraciones iniciales de fango en presencia de nematodos han mostrado

presencia de NO_3+NO_2 . A título de ejemplo, en los cultivos con fango al 25%, 35%, 50%, 60% y 75% (v/v) y en presencia de nematodos, la aparición de nitratos y nitritos se ha detectado a las 72, 146, 95, 96 y 72 horas de cultivo, respectivamente. Dicho rango de tiempo, se localiza al final de la fase exponencial de crecimiento de la población del nematodo *C. elegans*. La aparición de estos dos componentes se debe, como se ha indicado, a que se han establecido en el cultivo las condiciones adecuadas para la actividad de las bacterias de nitrificación: reducción en la carga orgánica después de la actividad del nematodo y presencia de oxígeno suficiente (Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015).

En todos los experimentos, la aparición de los contenidos en NO_3+NO_2 ha seguido una ecuación de reacción de orden cero, donde los valores de las constantes se muestran en la tabla V.10. La figura V.28 muestra que el incremento de las constantes de las ecuaciones de orden cero de la aparición de NO_3+NO_2 en función de la concentración inicial del fango utilizada en los cultivo sigue una ecuación lineal.

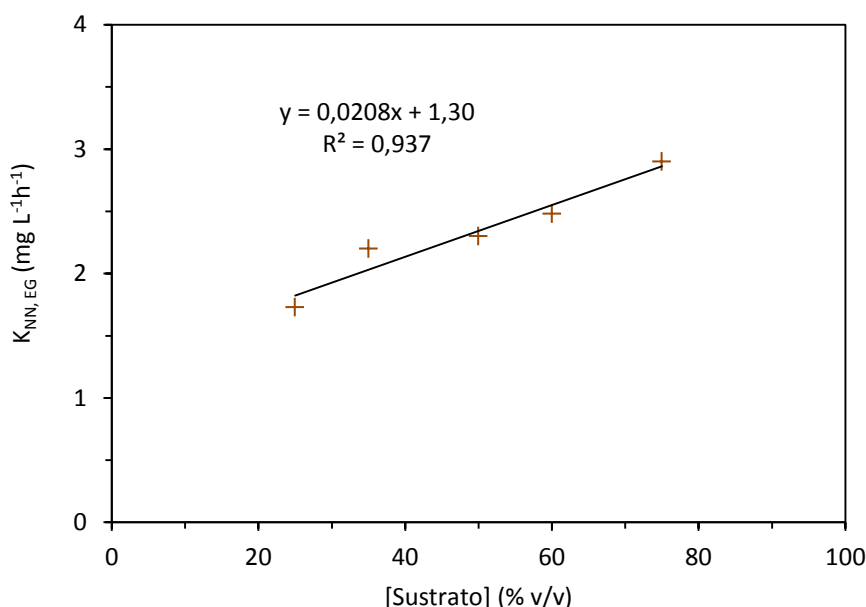


Figura V. 28. Variación de las constantes de las ecuaciones de orden cero de la aparición de los NO_3+NO_2 en función de la concentración inicial del fango. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

La figura V.29 muestra las concentraciones máximas de nitratos y nitritos registradas en los efluentes globales al final de los experimentos en función de la concentración inicial del fango en cada experimento. Como se puede observar, las máximas concentraciones del contenido en NO_3+NO_2 se registran para los cultivos con una concentración del fango inicial entre 50 y 60 % (v/v).

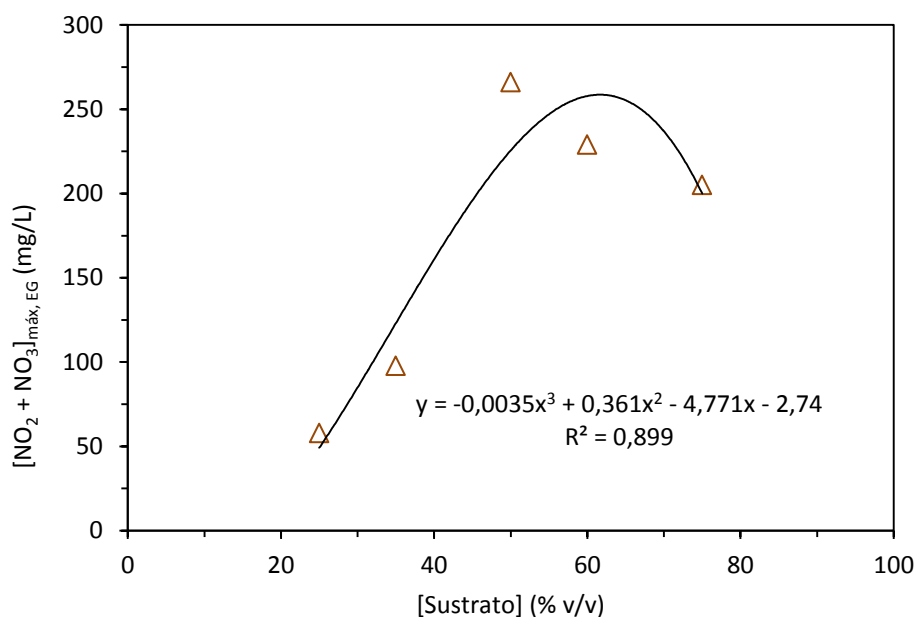


Figura V. 29. Variación de las concentraciones finales NO₃+NO₂ registradas al final de los experimentos en función de la concentración inicial del fango. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

A.2. Aqua tratada

En la tabla V.11 se pueden ver los diferentes parámetros determinados (COT, NT y NO₃+NO₂) para la fase líquida (agua tratada) en cuanto a las constantes de reacción (2º orden) y los porcentajes de eliminación/generación de los distintos parámetros determinados a lo largo de los experimentos. El cálculo de las constantes de reacción se ha llevado a cabo de forma similar a los calculados en el efluente global (Figura V.22).

En todos los experimentos se ha registrado una caída de los valores de CT y COT, lo que indica que el sistema fango-nematodo mejora la calidad del agua final obtenida. En cuanto al contenido en NT se ha observado que se reduce únicamente en el experimento de control (sin nematodos). Para concentraciones superiores de fango y en presencia del nematodo en el medio de cultivo el contenido en nitrógeno final se incrementa a lo largo de los experimentos (Tabla V.11). Este hecho puede explicarse considerando que en una digestión aerobia y en ausencia de nematodo el incremento de la biomasa microbiana implica la eliminación del nitrógeno de la fase líquida. Sin embargo, en presencia de nematodos a diferentes concentraciones de fango en el medio de cultivo, la población del mismo se alimenta a base de fango para incrementar su población, lo que implica una bajada de la cantidad de fango (reducción del COT) favoreciendo el proceso de nitrificación en presencia de oxígeno

suficiente (Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015).

Tabla V. 11. Constantes de reacción (en base a COT, NT y NO_3+NO_2) durante la fase exponencial del crecimiento del nematodo y porcentajes de eliminación del fango al final de cada experimento. Datos para la fase líquida a distintas concentraciones de sustrato.

Agua tratada								
[Sustrato] (% v/v)	$K_{\text{COT}, S} \times 10^6$ ($\text{L mg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	R^2	COT_{elim} (%)	$K_{\text{NT}, S} \times 10^6$ ($\text{L mg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	R^2	NT_{elim} (%)	$*K_{\text{NN}, S}$ ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	R^2
25 SIN Nematodos	12,2	0,902	56,8	-12,2	0,999	19,0	0,334	0,999
25	45,0	0,963	64,0	68,2	0,997	-43,5	0,350	0,976
35	23,4	0,999	49,0	-13,6	0,970	-65,8	1,25	0,965
50	16,9	0,926	33,0	-20,5	0,998	-112	1,90	0,973
60	6,40	0,671	27,4	-9,40	0,966	-92,5	2,31	0,980
75	0,709	0,999	13,0	-14,8	0,988	-106	2,76	0,998

* K_{NN} = Constante calculado para una ecuación de orden cero

Como se puede ver en la figura V.30 las constantes de degradación en base al COT son positivas (degradación de materia orgánica) y decrecientes con el incremento de la concentración inicial de fango en el medio de cultivo. Los valores calculados de las constantes de reacción en base al COT son superiores al obtenido en el experimento de control (Figura V.30) hasta una concentración de fango en el medio de cultivo de 50% (v/v). Para concentraciones superiores de 60% y 75% los valores de las constantes son inferiores al registrado en el experimento de control. Este hecho puede relacionarse con el menor crecimiento poblacional para los cultivos con una concentración inicial de fango superior al 60% (v/v). Además, aunque en términos absolutos pueda haber una mayor población para concentraciones del 50 y 60% (v/v), la relación entre el crecimiento poblacional máximo por ml de fango es superior para concentraciones iniciales del 25 y 35% (v/v).

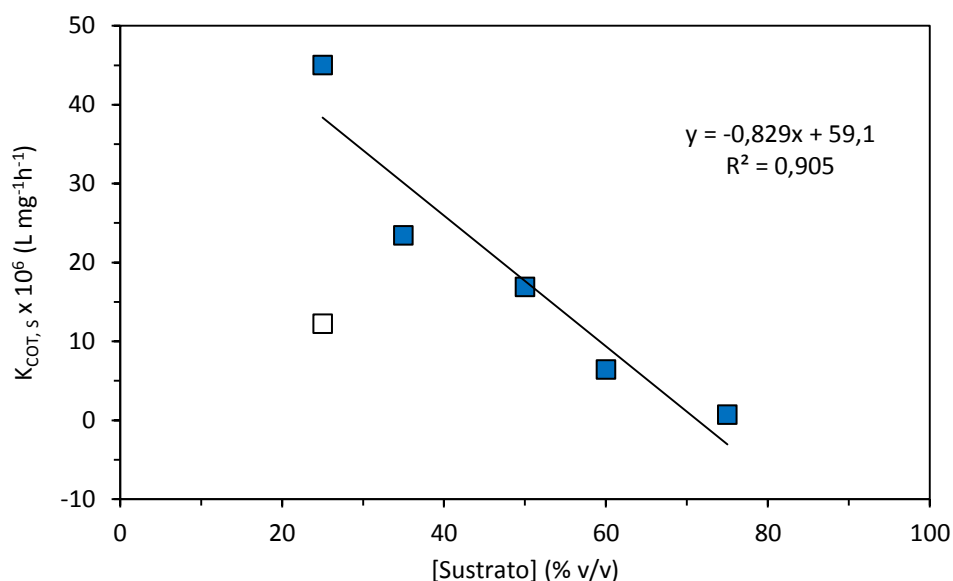


Figura V. 30. Constantes de degradación en base al contenido en COT en la fase líquida ($K_{COT,s}$) para diferentes concentraciones de sustrato (Fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

Por otra parte, se ha registrado una tendencia similar de los valores de los porcentajes de eliminación de COT (Figura V.31) a la tendencia registrada para las constantes de reacción (Figura V.30); donde el porcentaje de eliminación de COT en el experimento con nematodos ha sido superior al obtenido para el experimento de control al 25 % (v/v). Este resultado es de esperar puesto que a esta concentración se registra mayor población de nematodos proporcionalmente a la concentración de fango.

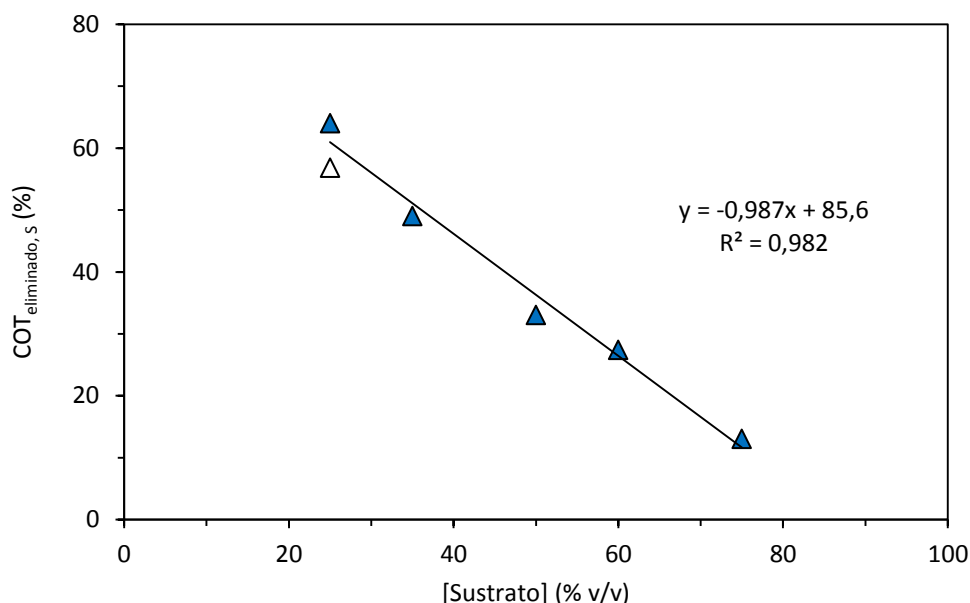


Figura V. 31. Porcentaje de degradación en base al contenido en COT en la fase líquida para diferentes concentraciones de sustrato (fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

En la figura V.32 se puede ver la variación de la constante de reacción en base al contenido en NT en función de la concentración inicial del sustrato en el medio de cultivo. En general, en los experimentos se tiende a incrementar el contenido en nitrógeno en la fase líquida debido al proceso de nitrificación (proceso aerobio), la excreción de amonio del nematodo y la transferencia de nitrógeno de la biomasa a la fase líquida. Aunque dicho proceso de nitrificación será menos efectivo a mayor concentración de carga orgánica (mayor porcentaje de fango inicial en el medio de cultivo). A una concentración inicial de fango del 25% (v/v) en presencia de nematodo se observa un valor positivo de la constante de degradación. Este hecho no se observa a altas concentraciones de fango, donde siempre se ha generado nitrógeno lo que implica que la presencia del nematodo en el medio provoca una reducción en la población microbiana favoreciendo la actividad de las bacterias nitrificadoras (reducción en la carga orgánica y presencia de oxígeno suficiente, Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015).

La aportación de nitrógeno a la fase líquida también puede estar causada por la excreción de los desechos del metabolismo del nitrógeno de los nematodos: principalmente amoníaco (NH₃) y, en menor medida, aminoácidos libres como se ha determinado para otras especies del género *Caenorhabditis* (Rothstein, 1963; Rothstein, 1965; Rothstein y Mayoh, 1965). Para *C. elegans* y otros nematodos pertenecientes al orden Rhabditida (*Panagrellus redivivus*) también se ha detectado

excreción de urea pero a menores concentraciones que el amonio (Wright, 1975a y Wright, 1975b). Cabe señalar que el NH_3 se encuentra en equilibrio químico con el amonio (NH_4^+), siendo más abundante la forma catiónica para pH alcalinos ($>7,8$), que a su vez presenta una elevada toxicidad (Adlimoghaddam et al., 2015).

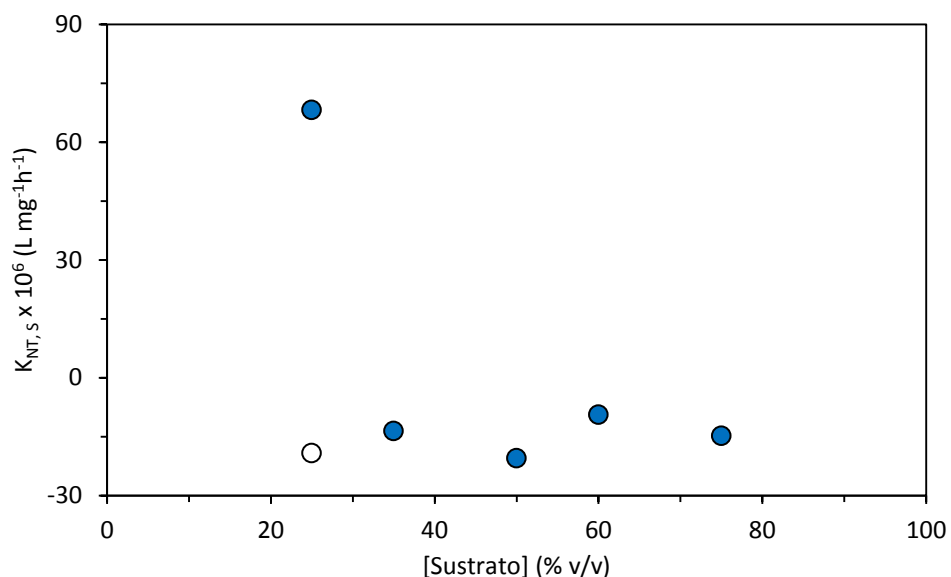


Figura V. 32. Constantes de degradación en base al contenido en NT en la fase líquida ($K_{NT,s}$) para diferentes concentraciones de sustrato (Fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

En cuanto al contenido en nitrógeno total la figura V.33 muestra la variación de los porcentajes de eliminación de NT al final de los experimentos en función de la concentración inicial de fango en el medio de cultivo.

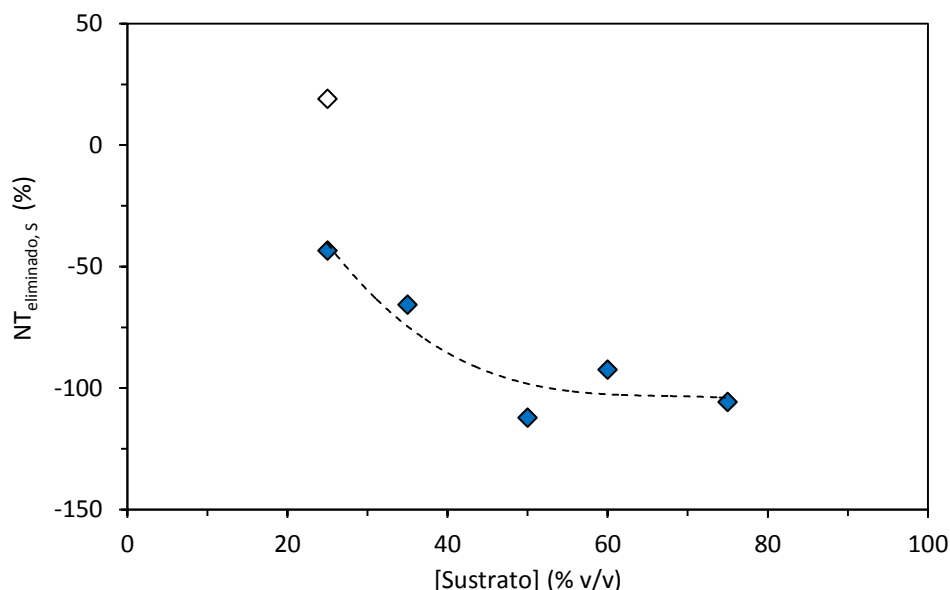


Figura V.33. Porcentaje de eliminación en base al contenido en NT en fase líquida para diferentes concentraciones de sustrato (fango). El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

Únicamente, se ha registrado una eliminación del contenido en nitrógeno total en los experimentos de control al 25% (v/v) de fango inicial sin nematodos. Este hecho es de esperar ya que la biomasa microbiana tiende a aumentar en condiciones aerobias eliminando nutrientes del medio de cultivo como es el caso del nitrógeno. En cuanto a los experimentos en presencia de *C. elegans* se ha incrementado el contenido del nitrógeno total en las aguas debido al consumo de la biomasa microbiana por parte de los nematodos, además del favorecimiento del proceso de nitrificación al reducir la carga orgánica; lo que aporta más nitrógeno a la fase líquida, junto con la excreción de NH_3 como desecho del metabolismo del nitrógeno (Figura V.33).

En relación al contenido en nitratos y nitritos ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$) en la fase líquida se observa la aparición de dichos compuestos en el experimento de control (sin nematodos) a partir de los 67 h y alcanzando una concentración máxima de ambos relativamente baja de 8,18 mg/L. Sin embargo, la presencia del nematodo en el medio de cultivo cambia este escenario de forma sustancial. A título de ejemplo, en el experimento en presencia de nematodo, y en las mismas condiciones que el control, la hora de aparición de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ es la misma, pero la concentración de los mismos es muy superior ($[\text{NO}_3 + \text{NO}_2] = 21,4$ mg/L). Además, se observa que el incremento de la concentración de los compuestos $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ es lineal y su duración es superior en presencia del nematodo (56 h) que en el caso del experimento de control (25 h). En general, observaciones similares se han registrado en el resto de la serie experimental,

donde se incrementa la duración de las fases lineales y la concentración máxima de NO_3+NO_2 con el incremento de la concentración inicial de fango en el medio de cultivo (Figura V.34).

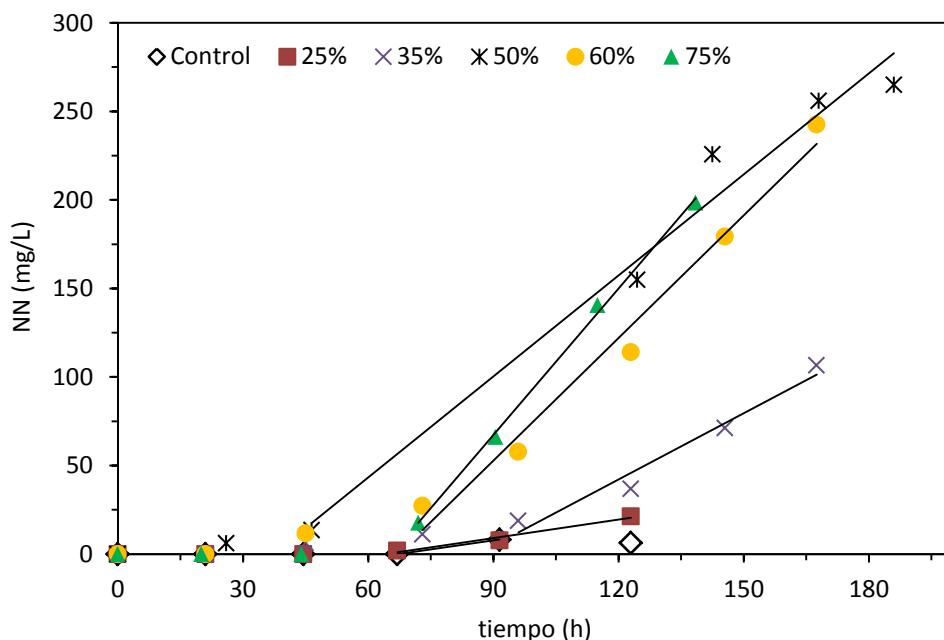


Figura V.34. Variación de las concentraciones de NO_3+NO_2 (NN) registrada en el agua tratada a lo largo de los experimentos con distintas concentraciones iniciales de fango. Las líneas sólidas representan las zonas de incremento lineal del contenido en NO_3+NO_2 . Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

En vista a la figura V.34 las pendientes de las zonas lineales (denominadas a partir de ahora constante K_{NN} de generación de NO_3+NO_2) se han calculado ajustándose a una ecuación lineal de primer orden por mínimos cuadrados. En la figura V.35 se ha representado la variación de las constantes de generación de NO_3+NO_2 en la fase líquida frente a la concentración inicial del fango en el medio de cultivo.

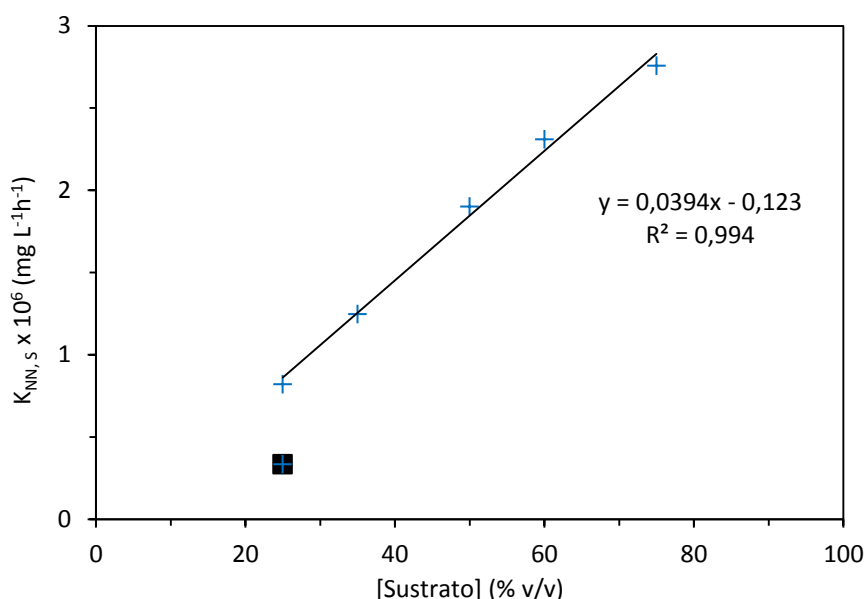


Figura V.35. Variación de las constantes de generación de NO_3+NO_2 en función de la concentración inicial del fango en la fase líquida. El símbolo con relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

En todos los casos, las constantes de generación de nitratos y nitritos (K_{NN}) han sido superiores al valor registrado en el experimento de control sin nematodo (Figura V.35). Además, cabe destacar que la aparición de NO_3+NO_2 se produce a partir de las 67 h en el caso del experimento control; lo cual indica una posible lisis celular o comienzo de un proceso de nitrificación al considerar la caída de la carga orgánica en la fase líquida al final de la digestión anaerobia (Figura V.35).

A.3. Biomasa (fango + nematodos)

Una vez estudiado el efluente global y la fase líquida, se ha abordado la cinética de degradación de la biomasa (fango + nematodos). En la figura V.36 se puede ver la diferencia en el comportamiento de la biomasa generada en función del tiempo en el caso de trabajar sin y con nematodos. En el experimento de control sin nematodos (figura V.36.A) se observa el incremento de la biomasa con el transcurso del tiempo, dicho aumento se ha determinado con los valores de CT, COT, CI y NT. Sin embargo, en el experimento en presencia de nematodos (figura V.36.B) y en las mismas condiciones se detecta de forma clara el descenso en los valores de CT, COT y NT a partir de las 20 h de cultivo (inicio de la fase exponencial del crecimiento del nematodo). Lo que confirma que los nematodos son capaces de reducir el contenido en carbono del fango.

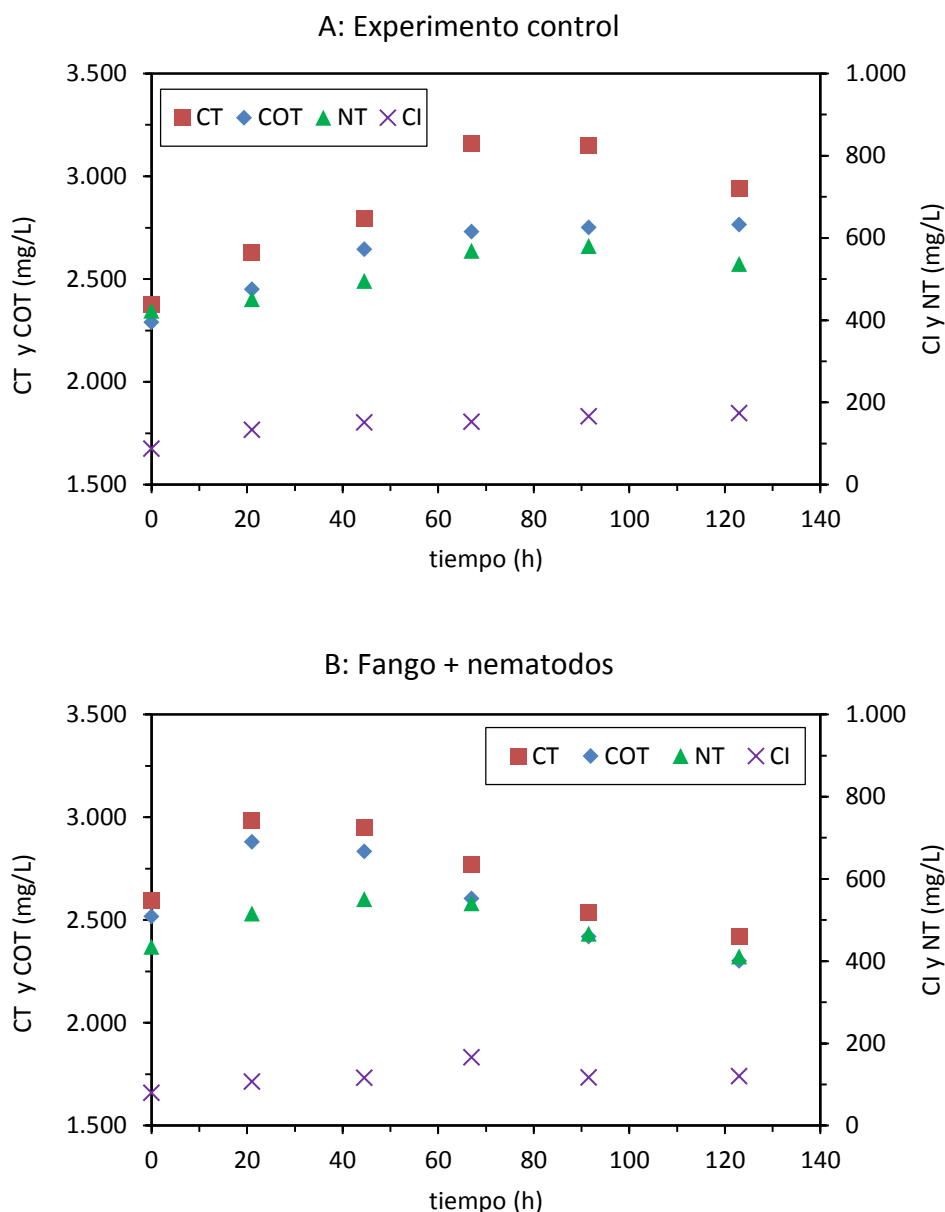


Figura V.36. Generación de biomasa (fango + nematodos) representada como CT, COT, NT y CI en función del tiempo: (A) Experimento de control: Fango solo y (B) Fango + nematodos. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

En la figura V.37 se observa el comportamiento de la biomasa total (fango + nematodos) a diferentes concentraciones de fango inicial. Se puede ver que se produce un incremento de biomasa total únicamente en el cultivo al 25% (v/v) de fango inicial. En cuanto al resto de concentraciones, se observa un descenso ligero para el 35% (v/v); mientras que esta reducción es más notable a concentraciones superiores de fango inicial. Sin embargo, a partir de las 70 h de cultivo se observa

crecimiento de la biomasa total; excepto para el cultivo al 50% (v/v) de fango inicial. Este hecho puede deberse a la muerte de los nematodos a partir de las 100 h de cultivo.

Por otra parte, en los cultivos al 50 y 60 % (v/v) de fango inicial, se observa una caída de la biomasa total; sin embargo, para el 60% (v/v) es estable a partir de las 100 h de cultivo mientras que para el cultivo al 50% (v/v) se produce una caída prolongada de la biomasa total. Este hecho puede indicar que el cultivo al 50% (v/v) de fango inicial puede ser el más estable en el tiempo desde el punto de vista operativo.

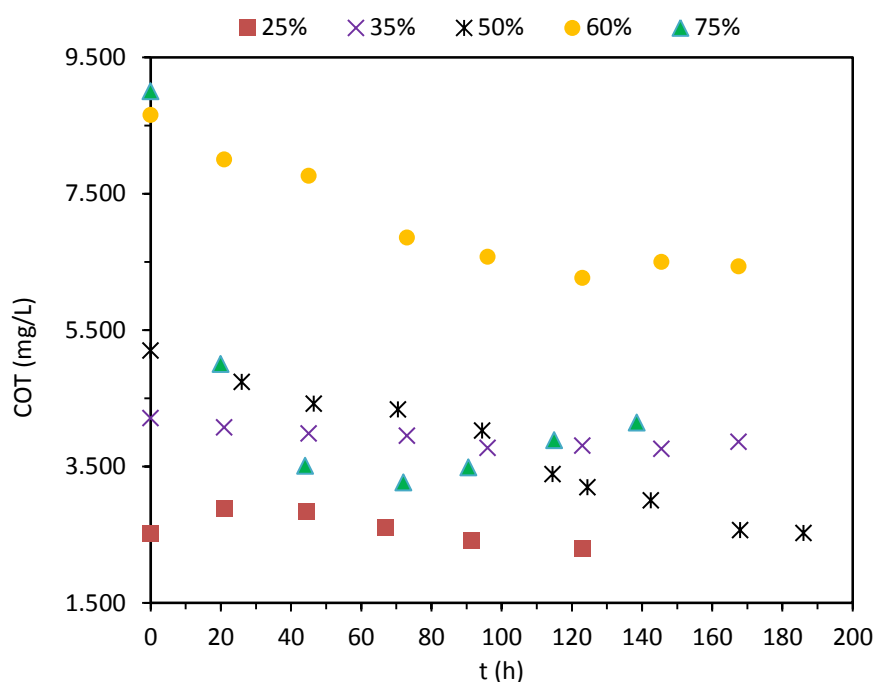


Figura V.37. Generación/reducción de biomasa total (Fango + nematodos) representada como COT en función del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de fango. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

En la figura V.38 se puede ver la representación gráfica de la variación del COT de la biomasa total (fango + nematodos) correspondiente a una reacción de segundo orden frente al tiempo de cultivo. La constante de reacción se ha determinado durante la fase Lag y exponencial del crecimiento del nematodo (línea sólida continua).

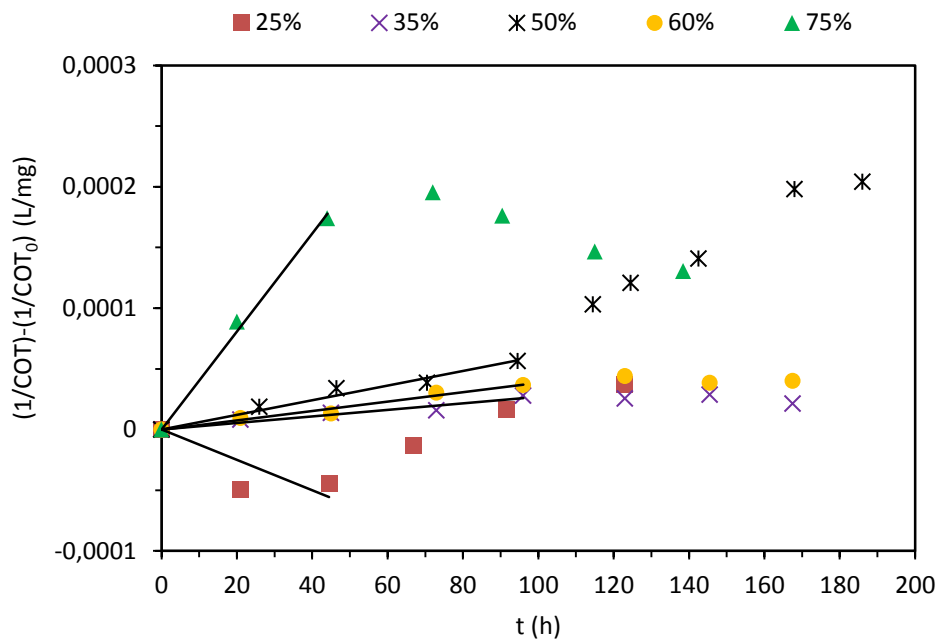


Figura V. 38. Representación gráfica, a diferentes diluciones del fango, del ajuste matemático a una ecuación de reacción de segundo orden (en base a COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para la biomasa total generada/reducida a distintas concentraciones de sustrato. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}C$.

De la misma forma, la figura V.39 muestra la representación gráfica de la variación del NT correspondiente a una reacción de segundo orden de la biomasa total (fango + nematodos) frente al tiempo de cultivo. La constante de reacción se ha determinado durante la fase Lag y exponencial del crecimiento del nematodo (línea sólida continua).

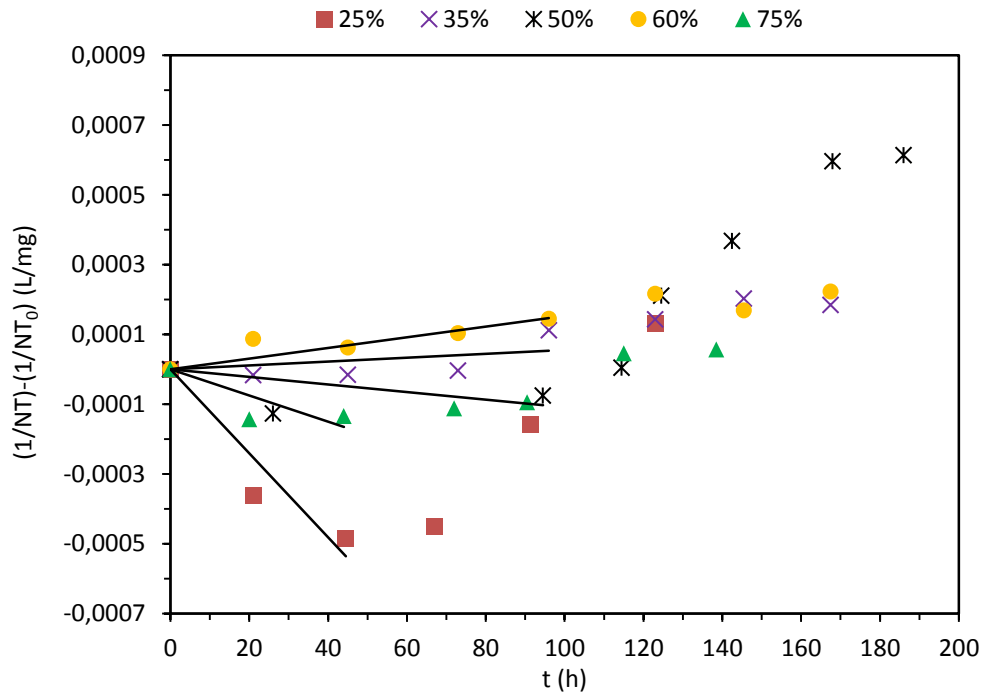


Figura V. 39. Representación gráfica, a diferentes diluciones del fango, del ajuste matemático a una ecuación de reacción de segundo orden (en base a NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para la biomasa total generada/reducida a distintas concentraciones de sustrato. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

La eliminación de la materia orgánica de la fase líquida por cada gramo de la biomasa total (fango + nematodos) se ha obtenido durante las fases Lag y exponencial de crecimiento del nematodo ajustando los datos experimentales a la ecuación V.7 (Ec.V.7 y Figura V.40):

$$(COT_0 - COT)_S = Y_{S/B} (COT - COT_0)_B \quad (\text{Ec. V.7})$$

Donde:

$(COT_0 - COT)_S$ = Diferencia entre COT inicial y final de la fase líquida tratada

$Y_{S/B}$ = Eliminación de materia orgánica de la fase líquida por gramo de biomasa total

$(COT - COT_0)_B$ = Diferencia entre COT final e inicial de la biomasa total

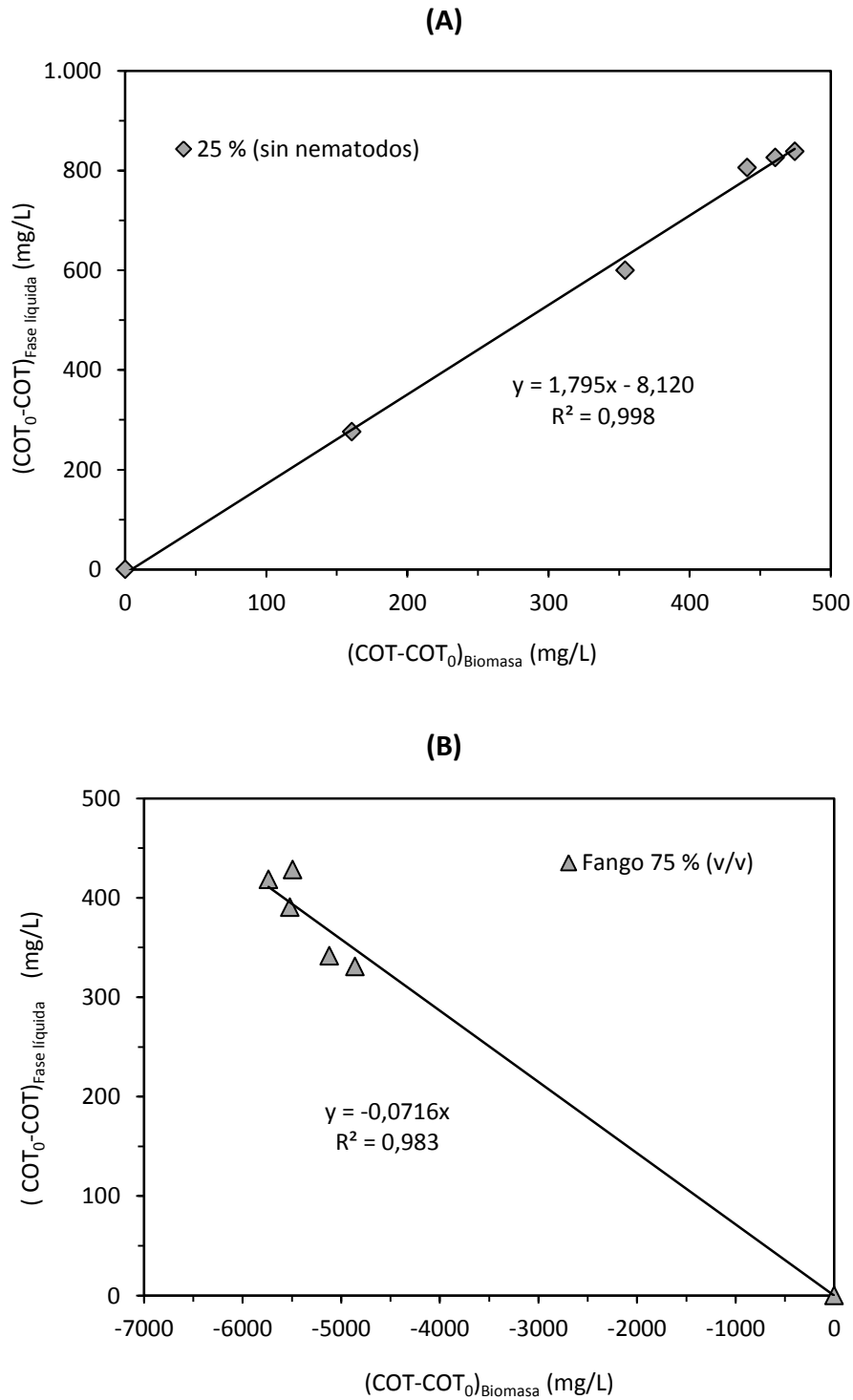


Figura V.40 Determinación del rendimiento en eliminación de la materia orgánica por cada gramo de biomasa total. (A) Experimento de control sin nematodos con fango al 25% (v/v), (B) Experimento en presencia de nematodos con fango al 75% (v/v). Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ C$.

En todos los experimentos (sin y con nematodos) se ha mejorado la calidad del residuo. Únicamente, se he registrado un incremento en la biomasa en el experimento

de control sin nematodo y que es de esperar porque se trata de un proceso aerobio donde la biomasa tiende a aumentar debido, principalmente, a la transferencia de materia de la fase líquida a la biomasa; aunque también es posible que se produzca fijación parcial de carbono por la actividad de microalgas del propio fango. Sin embargo, en el resto de los experimentos en presencia de nematodo se ha registrado una disminución en la biomasa global (fango + nematodos); lo cual sugiere que pueda deberse a la actividad del nematodo como depredador.

En la tabla V.12 se recogen los valores numéricos de las constantes de degradación/generación de la biomasa total (fango + nematodos) en base al carbono orgánico total, nitrógeno total y los rendimientos de fango degradado del sobrenadante por cada gramo de biomasa total.

Tabla V. 12. Constantes de reacción de segundo orden en base al contenido en COT y NT en la biomasa global y el rendimiento de degradación de la materia orgánica en función del COT en la fase líquida frente al incremento/reducción en la biomasa global.

Biomasa total						
[Sustrato] (% v/v)	$K_{COT, B} \times 10^7$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	$K_{NT, B} \times 10^6$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	$Y_{COTS/COTB}$ (g/g)	R ²
25 SIN Nematodos	-13,2	0,999	-7,80	0,997	1,80	0,998
25	-9,72	0,624	-10,8	0,907	2,96	0,941
35	2,57	0,941	0,980	0,482	-3,34	0,996
50	5,67	0,972	0,754	0,999	-2,00	0,921
60	9,29	0,999	1,24	0,798	-0,890	0,937
75	39,4	0,995	-2,93	0,646	-0,0710	0,983

En la figura V.41 se pueden ver las tendencias de las constantes de degradación/generación de biomasa en función de los contenidos en COT y NT. Las constantes respecto al contenido en COT muestran valores negativos en el experimento al 25% (v/v) sin y con nematodo indicando un incremento del contenido en carbono en la fracción de biomasa global. Sin embargo, en el resto de los experimentos, a concentraciones de fango inicial superiores al 25% (v/v), se han obtenido valores positivos de la constante de reacción en base al COT; lo cual indica reducción en la biomasa total. Esta reducción es mayor conforme se incrementa la concentración inicial de fango (Figura V.41A).

En cuanto al contenido en nitrógeno en la biomasa final se observan valores negativos en los experimentos al 25% (v/v) y 75% (v/v) de fango inicial, indicando un incremento en el contenido de nitrógeno en la biomasa total. Sin embargo, en los experimentos realizados con una concentración de fango inicial entre 35% y 60% (v/v)

se han registrado valores positivos de las constantes de reacción indicando una reducción en el contenido en el nitrógeno de la biomasa global; aunque en términos cuantitativos sea casi despreciable (Figura V.41B).

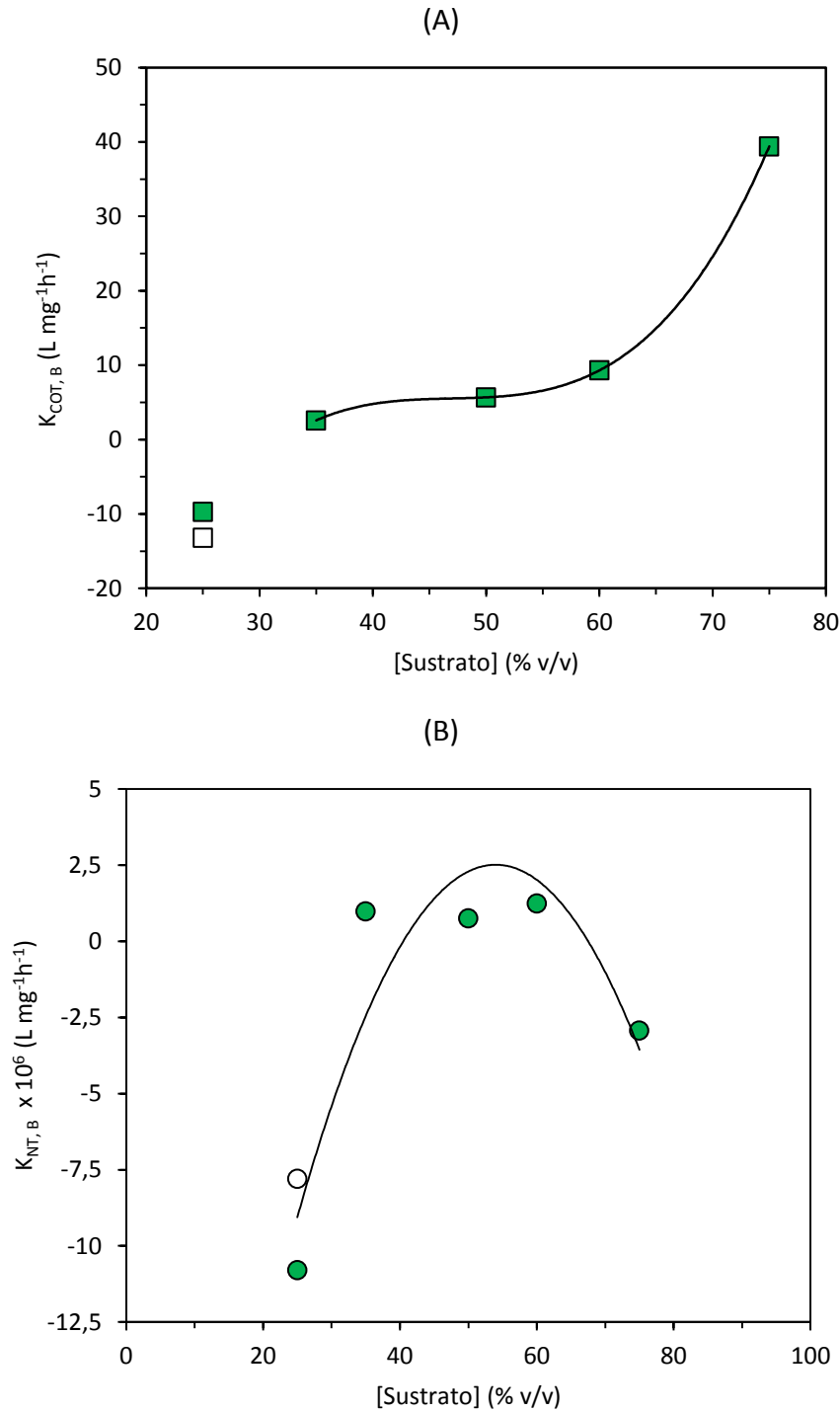


Figura V. 41. Constantes de degradación/generación de la biomasa total (fango + nematodos) a base del contenido en COT (A) y NT (B) para diferentes concentraciones de sustrato. El símbolo sin relleno muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: $[fango]_{inicial}$ = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}C$.

La figura V.42 muestra la tendencia del rendimiento de eliminación de la materia orgánica de la fase líquida en función de la biomasa global generada/reducida. Se observa que la máxima reducción en la biomasa global se ha alcanzado en el experimento al 35% (v/v) de fango inicial y esta reducción disminuye linealmente (en valor absoluto) con el incremento de la concentración de fango inicial.

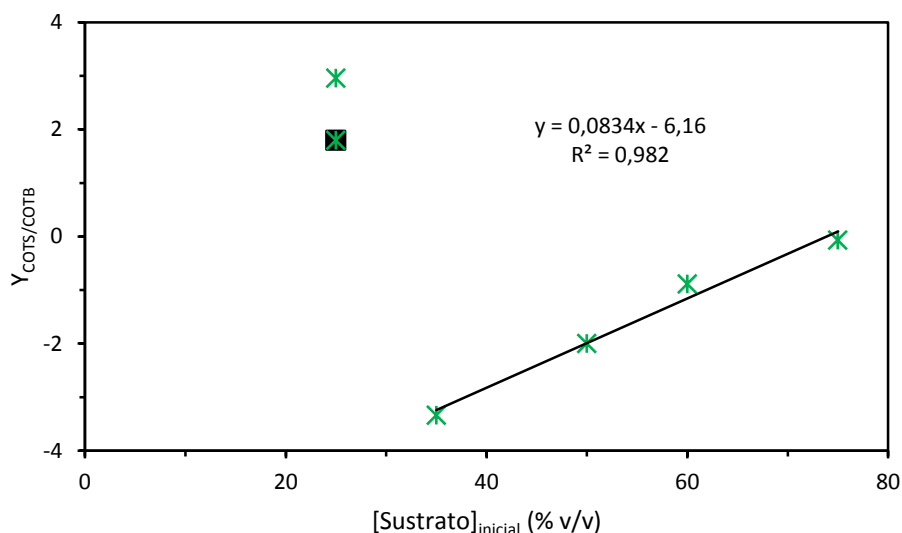


Figura V. 42. Rendimiento en la materia orgánica eliminada del agua (sobrenadante) por cada gramo de biomasa total generado/eliminado. El símbolo con relleno negro muestra el experimento control sin nematodos. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = variable (% v/v), aireación = 2 L/min, agitación = 260 rpm y T = 20°C.

B) Influencia de la velocidad de suministro de aire

Como se ha mencionado previamente, el nematodo *C. elegans* es un organismo aerobio. Además, debido a que el propio fango es un sistema vivo, la aireación puede tener efectos considerables sobre las poblaciones microbiológicas existentes, ya sea por potenciar o restringir la presencia de unos u otros organismos, o por la modificación de la actividad metabólica de los mismos. De hecho, la oxigenación es uno de los métodos de lisis celular utilizados para la reducción de fango (Abbassi et al., 2000; Khursheed y Kazmi, 2011). Por tanto, es un parámetro crítico en el proceso abordado en este trabajo de investigación.

En esta serie experimental, se han realizado ensayos con diferentes caudales de suministro de aireación (Q, L/min) manteniendo constantes los parámetros de temperatura (20°C), concentración inicial del fango (25% v/v) y la velocidad de agitación mecánica (260 rpm) empleando un aspa tipo “U”.

B.1. Efluente global

En la figura V.42 se puede ver la representación gráfica (en base al contenido en COT) correspondiente a una reacción de segundo orden y los ajustes obtenidos durante las fases Lag (en caso de existencia) y exponencial del crecimiento del nematodo *C. elegans*. Las pendientes de estas rectas corresponden a la constante de degradación ($K_{COT, EG}$) de la materia orgánica en base al contenido en COT.

La tabla V.13 recoge los valores de la constante de degradación durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Además de los porcentajes de reducción en el efluente global, tanto a finales de la fase exponencial como al final de cada experimento. Las tendencias de los diferentes parámetros en función del caudal de suministro de aire muestran que para conseguir altos valores de la constante de degradación del fango total se debe de operar en un rango de 0,5 a 1 L/min (Figura V.43).

La constante de degradación del COT ($K_{COT, EG}$) indica la velocidad a la que se degrada el carbono orgánico del fango total durante el cultivo de *C. elegans*. En la figura V.43 se puede observar que dicha constante tiene un valor de $8,37 \times 10^{-7} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en ausencia de aireación por burbujeo. Al introducir un caudal de aireación de 0,5 y 1 L/min, el valor de esta constante se duplica hasta $17,7 \times 10^{-7}$ y $16,8 \times 10^{-7} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, para caudales de aireación superiores a 1 L/min, la tendencia observada es una disminución de las $K_{COT, EG}$ hasta valores de casi un orden de magnitud inferior al máximo observado. En cuanto a los porcentajes de eliminación del fango total, en base al carbono orgánico total, se ha observado que la máxima

eliminación coincide con los valores máximos de las constantes de degradación (Figura V.44).

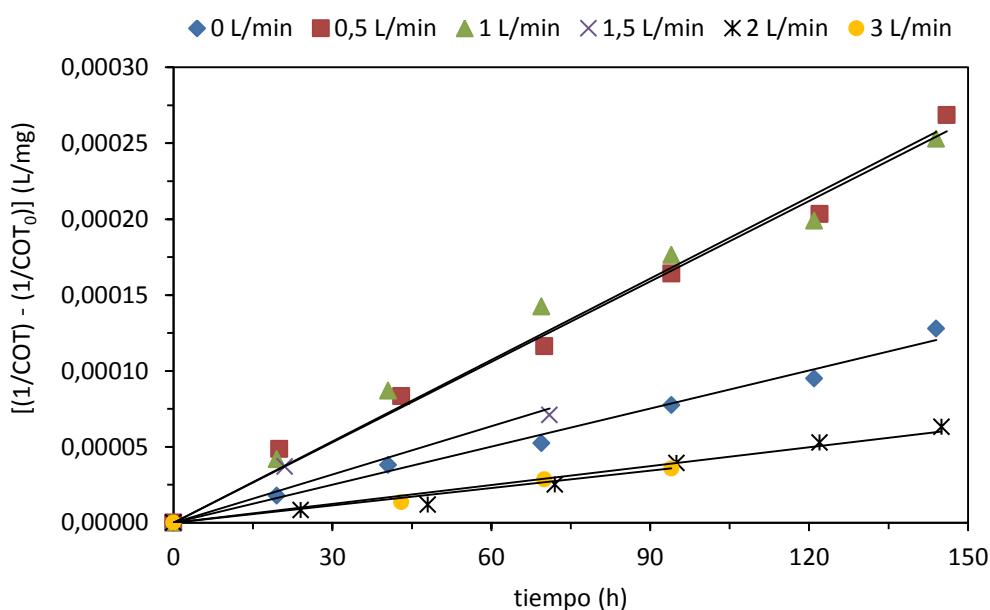


Figura V. 42. Representación gráfica, a diferentes velocidades de suministro de aire, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

Tabla V. 13. Constantes de reacción (en base al COT y NT), porcentajes de eliminación del fango total en base al carbono orgánico total (COT) y del nitrógeno total (NT) calculados a finales de la fase exponencial (%COT_{Exp}) y a final de cada experimento (%COT_{Final}) en el efluente global para distintos caudales de aireación.

Efluente global								
Q (L/min)	K _{COT, EG} × 10 ⁷ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	%COT _{elim}		K _{NT, EG} × 10 ⁶ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	NT _{elim}	
			%COT _{Exp}	%COT _{Final}			%NT _{Exp}	%NT _{Final}
0	8,37	0,988	8,90	24,7	2,62	0,885	7,62	4,80
0,5	17,7	0,990	27,2	37,9	1,32	0,969	6,56	8,97
1	16,8	0,986	31,9	40,2	0,892	0,997	4,91	4,18
1,5	9,40	0,936	12,7	12,7	-0,693	0,990	-3,56	-5,71
2	5,68	0,990	10,4	10,9	-1,480	0,975	-4,36	-1,42
3	3,91	0,978	9,14	7,67	-2,76	0,912	-12,2	-12,3

Sin embargo, al diferenciar entre los porcentajes de reducción al final de la fase exponencial y al final de cada experimento, se ha detectado que la reducción en el fango total no se produce de manera creciente a todas las velocidades de aireación;

pudiendo distinguir entre los experimentos llevados a cabo con caudales de aireación inferiores a 1 L/min y los experimentos llevado a cabo a caudales superiores. De forma que a caudales inferiores a 1 L/min, durante todo el experimento se observa una eliminación creciente de la materia orgánica; mientras que a caudales de aire superiores a 1 L/min, los porcentajes de eliminación de materia orgánica no se incrementan después de la fase exponencial de crecimiento (Figura V.44) indicando un equilibrio entre el incremento de la biomasa del fango total y la reducción por depredación del nematodo, después de la fase exponencial de crecimiento de *C. elegans*. Por tanto, el nematodo no mantiene la reducción de materia orgánica a lo largo del experimento en el caso de aplicar caudales de aire superiores a 1 L/min (Figura V.44).

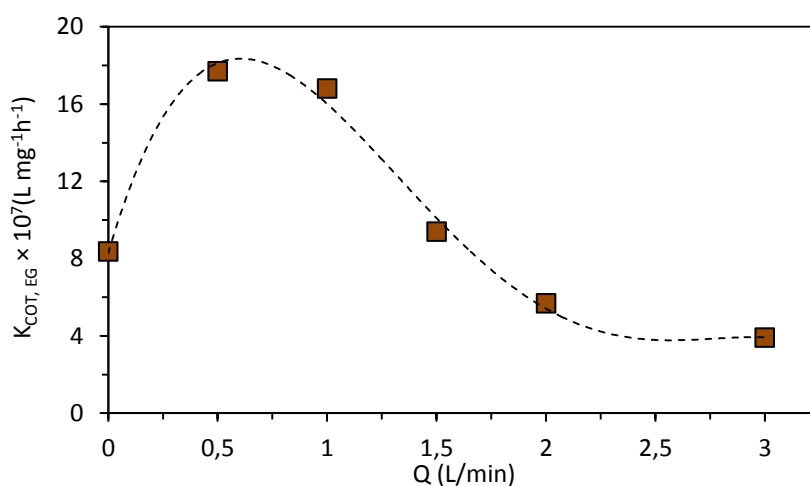


Figura V. 43. Variación de las constantes de degradación del COT en el efluente global ($K_{COT, EG}$) para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}C$.

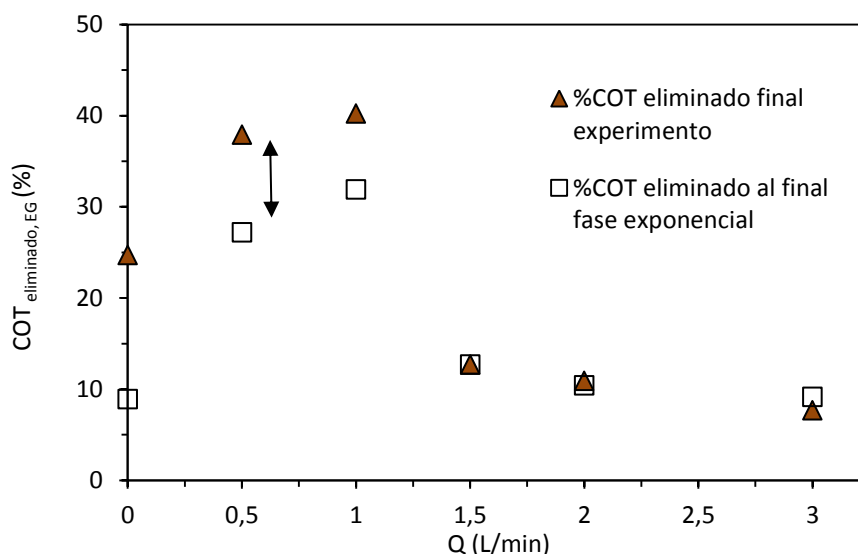


Figura V. 44. Variación de los porcentajes de degradación del COT en el efluente global (%) al final del experimento y al final de la fase exponencial; para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

En cuanto a las variaciones en la concentración de nitrógeno a lo largo del cultivo de *C. elegans*, han sido estudiadas para describir la influencia del crecimiento de la población de nematodos y el caudal de aireación en el contenido en nitrógeno del fango total. Por tanto, al igual que se ha realizado para el carbono, se han determinado las constantes de degradación ($K_{\text{NT, EG}}$ -Figuras V.45 y V.46-) y el porcentaje de reducción del nitrógeno total para diferentes caudales de aireación ensayados (Figura V.47).

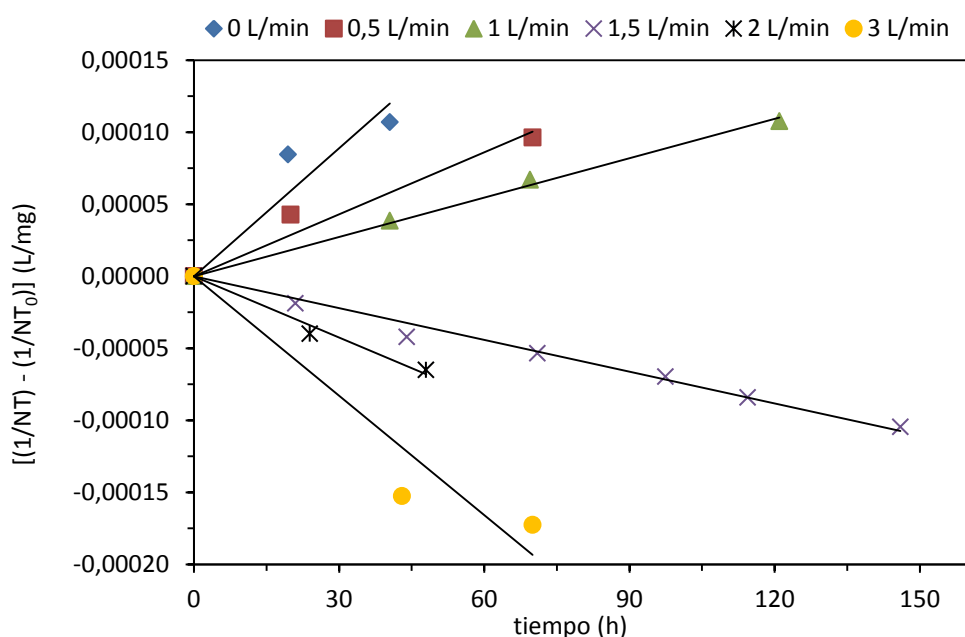


Figura V. 45. Representación gráfica, a diferentes velocidades de suministro de aire, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

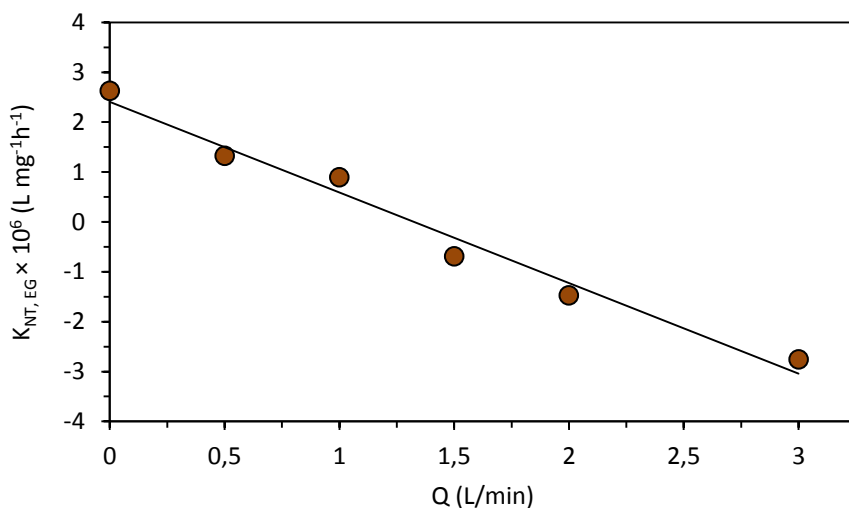


Figura V. 46. Variación lineal de los valores de las constantes de degradación del NT en el efluente global ($K_{NT, EG}$) para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

En las figuras V.45 y V.46 se observan valores positivos de las constantes de reacción de segundo orden, en base al NT, cuando se opera a velocidades de

suministro de aire inferiores a 1 L/min, indicando una reducción en el contenido total en nitrógeno. Sin embargo, a velocidades de suministro de aire superiores, los valores de las constantes de la reacción son negativos indicando un incremento en el contenido nitrógeno en el efluente global. En general, la constante de reacción disminuye de forma lineal con el incremento de las velocidades de suministro de aire. Este hecho puede ser justificado considerando que en los cultivos sin aireación ($Q = 0$ L/min) existe una digestión anaerobia que implica una reducción en la biomasa global del fango. Conforme se suministra aire, el proceso pasa de ser anaerobio a ser aerobio, implicando un aumento de biomasa de los microorganismos del propio fango; paralelamente, el nematodo se alimenta de esta biomasa de fango implicando su reducción neta. Cuando se aplican caudales de suministro de aire superiores a 1 L/min, el nematodo no es capaz de seguir reduciendo el crecimiento global de la biomasa de fango, provocando una generación de biomasa de fango superior a la capacidad de reducción que tiene el nematodo.

En la tabla V.13 y la figura V.47, se puede ver la variación de los porcentajes de nitrógeno total (al final de la fase exponencial del crecimiento del nematodo y al final del experimento). De forma similar que ocurre con el contenido de COT, la eliminación de nitrógeno se realiza a caudales de suministro de aire iguales o inferiores a 1 L/min. Por otra parte, cabe destacar que desde el punto de vista del contenido en nitrógeno, operar a un caudal de 0,5 L/min permite una eliminación continuada a lo largo del experimento (Figura V.47).

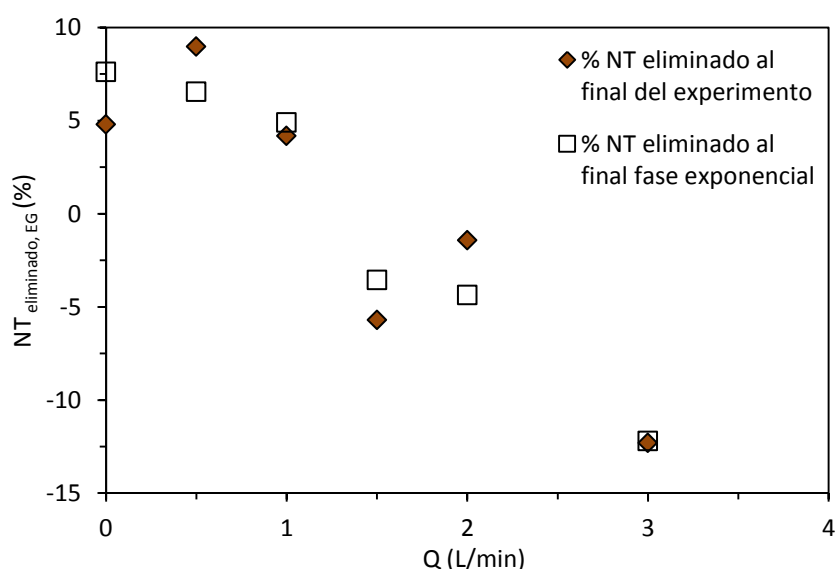


Figura V. 47. Porcentaje de eliminación del NT en el efluente global (%) al final de la fase exponencial de crecimiento del nematodo y final del experimento para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

A pesar de que en la serie experimental de concentraciones de sustrato aparecieron nitratos y nitritos, en estos ensayos no se han detectado (límite de detección = 1 mg/L). La hipótesis planteada es que los nitratos y nitritos pueden existir en concentraciones de trazas; ya que, de hecho, las menores concentraciones detectadas fueron para una dilución del fango al 25% v/v; y en esta serie experimental es la concentración de sustrato utilizada para todas las velocidades de aireación estudiadas.

B.2. Aqua tratada

En las figuras V.48 y V.49 se muestra el ajuste matemático a una ecuación de segundo orden de la variación de los contenidos en carbono orgánico total y nitrógeno total en la fase de agua tratada (sobrenadante); durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Las pendientes de estas ecuaciones a cada velocidad de suministro de aire representan los valores de las constantes de eliminación o liberación de los contenidos en COT y NT de la fase acuosa.

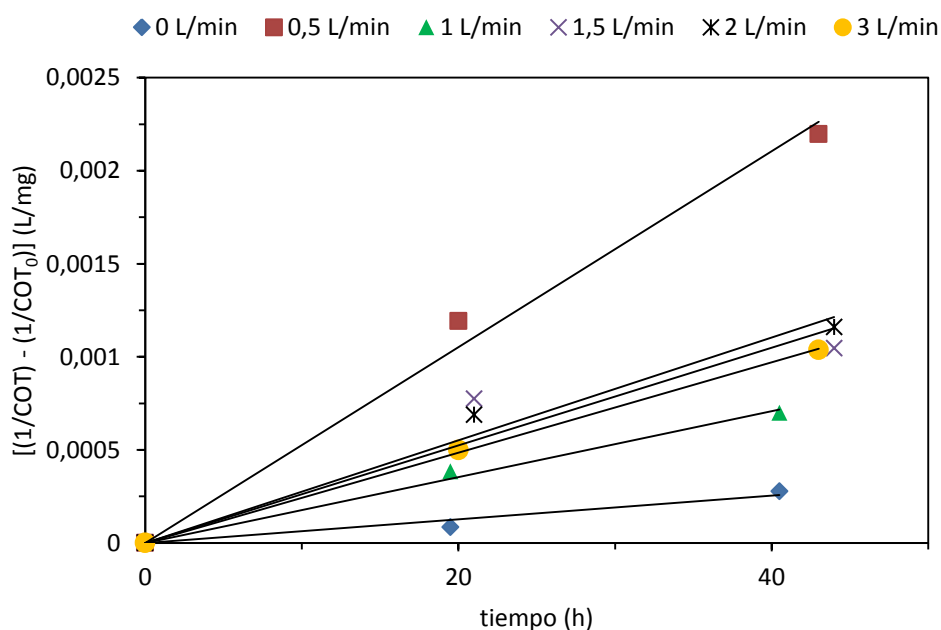


Figura V. 48. Representación gráfica, a diferentes velocidades de suministro de aire, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el agua tratada. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

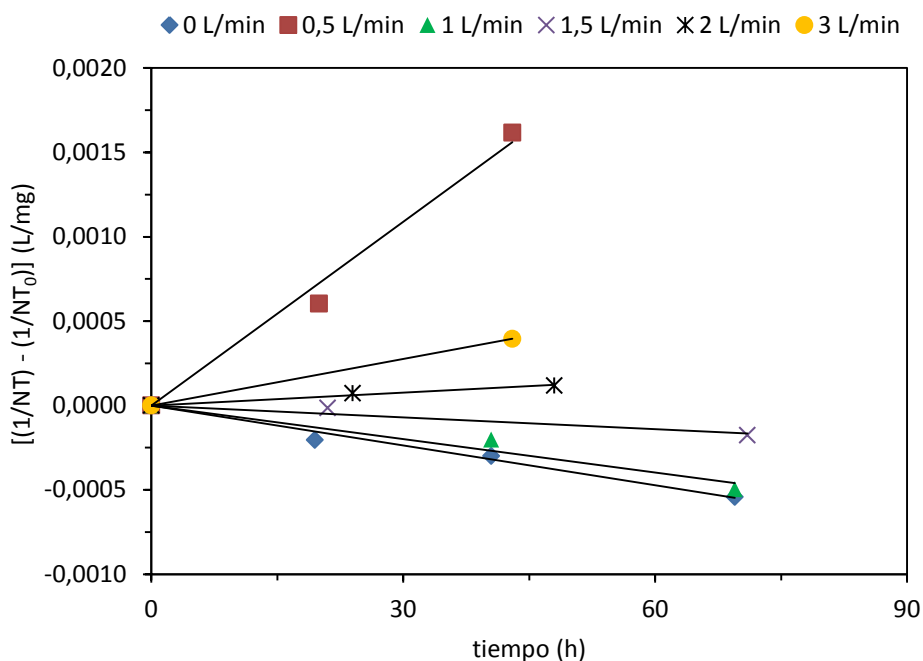


Figura V. 49. Representación gráfica, a diferentes velocidades de suministro de aire, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base a NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el agua tratada. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

La tabla V.14 recoge dichas constantes de eliminación o liberación de COT y NT de la fase clara a lo largo de las fases Lag y exponencial de crecimiento del nematodo para distintas velocidades de suministro de aire.

Tabla V. 14. Constantes de reacción (en base al COT y NT), porcentajes de eliminación de la fase clara en base a carbono orgánico total y del nitrógeno total (NT) calculados a finales de la fase exponencial (%COT_{Exp}) y al final de los experimentos (%COT_{Final}) para distintos caudales de aireación. Además, del rendimiento de eliminación o liberación de COT en la fase clara por cada gramo de biomasa (nematodo + fango).

Agua residual tratada										
Q (L/min)	K _{COT, s} × 10 ⁶ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	%COT _{elim}		K _{NT, s} × 10 ⁶ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	%NT _{elim}		Y _(COTS/COTB)	R ²
			%COT _{Exp}	%COT _{Final}			%NT _{Exp}	%NT _{Final}		
0	6,36	0,951	19,0	58,2	-7,88	0,980	-7,49	6,96	0,943	0,983
0,5	52,7	0,990	66,1	73,1	36,3	0,987	26,6	-9,88	3,67	0,929
1	17,7	0,992	57,6	55,5	-7,02	0,960	-10,5	-10,4	1,04	0,884
1,5	26,2	0,896	50,3	51,6	-2,62	0,953	-4,68	-2,01	-1,64	0,892
2	27,6	0,978	51,8	48,2	2,55	0,981	-0,23	-13,5	-3,92	0,941
3	24,1	0,999	46,9	24,3	9,19	0,999	7,89	-32,9	-3,19	0,970

Los valores de las constantes de la ecuación de segundo grado en base al COT para todas las velocidades de suministro de aire ensayadas han sido positivos. Lo que significa que en todos los experimentos, durante las fases Lag y exponencial de crecimiento del nematodo, se ha registrado una mejora en la calidad del agua tratada. Este hecho puede ser justificado considerando que tanto la actividad microbiana como la del nematodo, tienen un impacto positivo retirando la materia orgánica de la fase clara.

En la figura V.50 se puede ver la tendencia registrada de las constantes de la ecuación de segundo grado al variar la velocidad de suministro de aire en los cultivos de nematodos. Esta tendencia indica un máximo de retirada de materia orgánica calculada en base al COT ($52,7 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al operar con un caudal de aire de 0,5 L/min para luego mantenerse en torno a un valor medio de $23,9 \pm 3,78 (\times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1})$. Este hecho es consistente con la alta población de nematodos obtenida a 0,5 L/min y la baja generación de biomasa de fango como resultado de la actividad aerobia de los microorganismos existentes en el fango considerando el bajo valor de aire suministrado al birreactor (0,5 L/min).

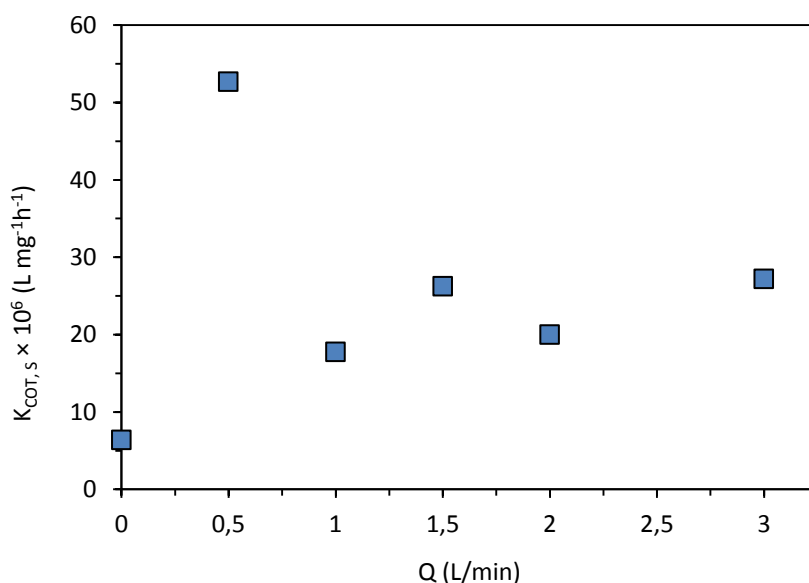


Figura V. 50. Variación de las constantes de degradación del COT ($K_{COT,s}$) en la fase clara para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \%$ (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

Un comportamiento similar a lo observado en la variación de las constantes, se ha obtenido para los porcentajes de eliminación de la materia orgánica de la fase clara en base al COT; registrando los máximos porcentajes de eliminación al final de la fase exponencial del crecimiento de *C. elegans* (66,1 %) y al final del experimento (73,1%), para un caudal de suministro de aire al biorreactor igual a 0,5 L/min (Figura V.51). En

este sentido cabe indicar que los porcentajes de eliminación del contenido en COT al final de la fase exponencial del crecimiento del nematodo y a final del experimento se han mantenido muy próximos al operar utilizando caudales de suministro de aire entre 0,5 y 2 L/min. Sin embargo, al operar en el límite superior de los caudales de suministro de aire estudiados (3 L/min) se ha registrado un incremento en la materia orgánica de la fase clara en el rango entre el final de la fase exponencial y el final del experimento. Este hecho puede explicarse considerando una posible inhibición del crecimiento de la población de nematodo a altos caudales de aireación (cabe recordar también el efecto de arrastre de los nematodos hacia la superficie del medio de cultivo a altos caudales de aire) y el aumento de la lisis celular al favorecer el proceso aerobio de la población de *C. elegans*; lo que permitiría el paso de la materia orgánica degradada hacia la fase clara (Figura V.51).

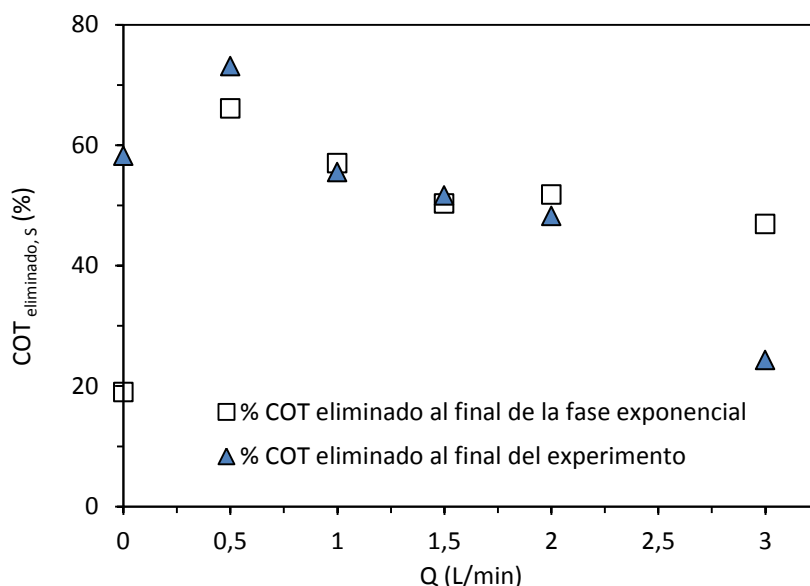


Figura V. 51. Variación de los porcentajes de degradación del COT en el agua tratada para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: [fango]_{inicial} = 25 % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y T = 20°C.

Por otra parte, las variaciones en la concentración de nitrógeno total en el agua residual tratada durante el cultivo de *C. elegans*, describen la influencia del crecimiento de la población de nematodos y el caudal de aireación en el contenido del nitrógeno en la fase líquida. En la figura V.52 se observa la variación de la constante de eliminación de nitrógeno (o liberación de nitrógeno -signo negativo-) en la fase clara. Al operar a un caudal de aire nulo no se detecta una población apreciable de los nematodos en el medio de cultivo, lo que pone de manifiesto que el medio de cultivo será gobernado por la digestión anaerobia de los microorganismos del fango provocando la degradación celular y la liberación de nitrógeno hacia la fase clara. Al

al aumentar el caudal de aire se aumenta la actividad microbiana del fango (pasa de proceso anaerobio a un proceso aerobio) y se incrementa la población de nematodos provocando una retirada notable de nitrógeno de la fase clara registrando su máximo valor para la constante de degradación de nitrógeno en $36,3 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Al seguir aumentando el caudal de aire, se mantiene la población de nematodos reduciendo la biomasa del fango y liberando restos celulares hacia la fase clara provocando el incremento de NT en el agua tratada hasta caudales de aire de 1,5 L/min a partir del cual empieza a preponderar el proceso aerobio de los microorganismos del propio fango, provocando un ligero incremento de nitrógeno total en el agua tratada.

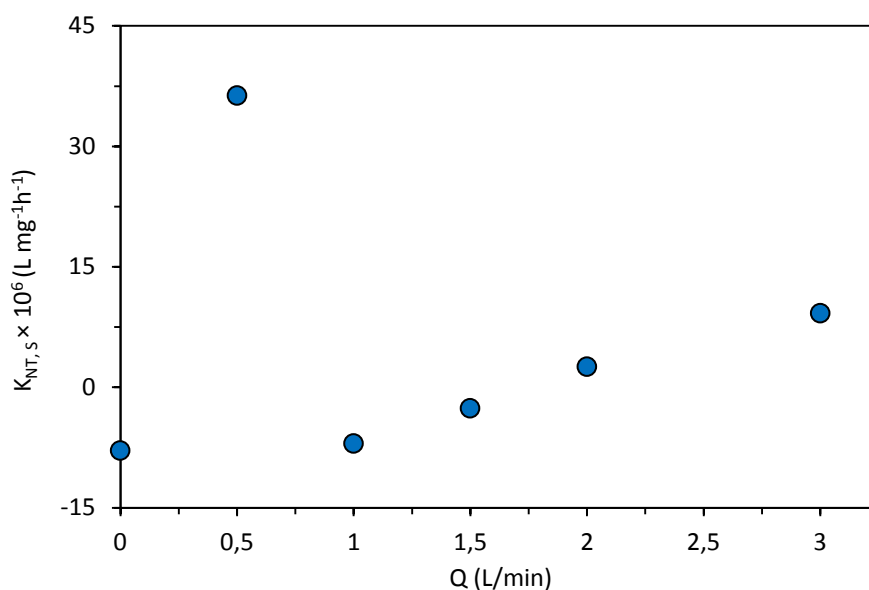


Figura V. 52. Variación de los valores de las constantes de degradación del contenido en NT en el agua tratada para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

En cuanto a los porcentajes de eliminación del NT de la fase clara, en la figura V.53 se observa la variación de los porcentajes de eliminación o liberación del nitrógeno de la fase clara. Durante la fase exponencial de crecimiento del nematodo se observa que únicamente se obtienen porcentajes de eliminación de nitrógeno cuando se opera a alta velocidad de aire (3 L/min); lo cual se justifica por el proceso aerobio, el incremento de la biomasa del fango y el crecimiento elevado de la población del nematodo que se acompaña con mayor retirada de nitrógeno del agua (fase clara).

Al final de los experimentos, se ha registrado un ligero porcentaje de eliminación de nitrógeno total (6,96%) de la fase clara en los ensayos sin aireación, que se justifica por la retirada de dicho nitrógeno debido a la necesidad nutricional de la biomasa del fango. En los experimentos con aireación donde se registra crecimiento del nematodo se ha determinado liberación de nitrógeno hacia la fase clara que se

puede explicar considerando la alimentación del nematodo a base de la biomasa microbiana del fango y por la propia excreción desechos metabólicos del nitrógeno por parte de *C. elegans*.

Por otra parte, cabe señalar que se ha observado una zona ($Q = 0,5-1,5$ L/min) donde coinciden los porcentajes de liberación de nitrógeno hacia la fase clara, para los porcentajes de liberación de nitrógeno determinados al final de la fase exponencial del crecimiento del nematodo y al final de los experimentos. Esta zona característica puede indicar una zona de estabilidad para operar con el mínimo porcentaje de nitrógeno liberado hacia la fase clara y máxima eliminación de materia orgánica. A caudales superiores a 1,5 L/min la liberación de nitrógeno hacia la fase clara es incontrolable que alcanza un porcentaje de liberación de nitrógeno igual a -32,9% (Figura V.53).

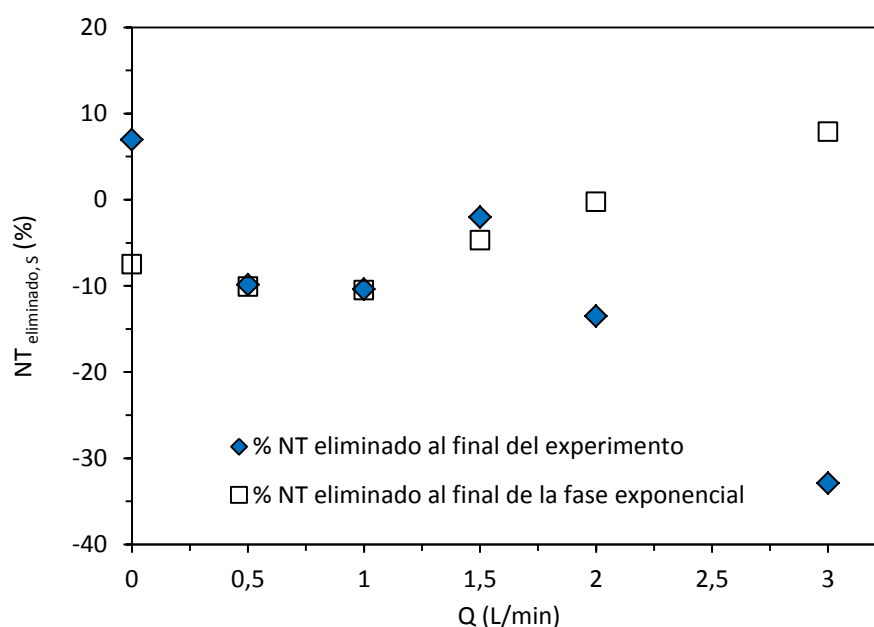


Figura V. 53. Porcentaje de eliminación del NT en el agua tratada (%) al final de la fase exponencial de crecimiento del nematodo y final del experimento para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25$ % (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

En adición, durante la fase exponencial del crecimiento del nematodo se ha determinado el rendimiento en base a gramos de COT eliminado o liberado del agua por cada gramo de biomasa total generado o degradado ($\text{COT}_s/\text{COT}_B$) de forma similar a lo visto en la figura V.40. Este rendimiento es indicador de la calidad del agua donde tener valores con signo positivo indica eliminación de materia orgánica de la fase clara y cuando aparece con signos negativos indica que se libera materia orgánica hacia la fase clara.

La figura V.54 muestra los rendimientos calculados a partir de los experimentos a diferentes velocidades de suministro de aire. Otra vez y de forma clara queda patente que operar con caudales de suministro de aire en el rango 0-1,5 L/min permite conseguir una fase clara (agua tratada) de mejor calidad y operar en los birreactores a velocidades de suministro de aire superiores provoca empeoramiento de la calidad del agua final obtenida.

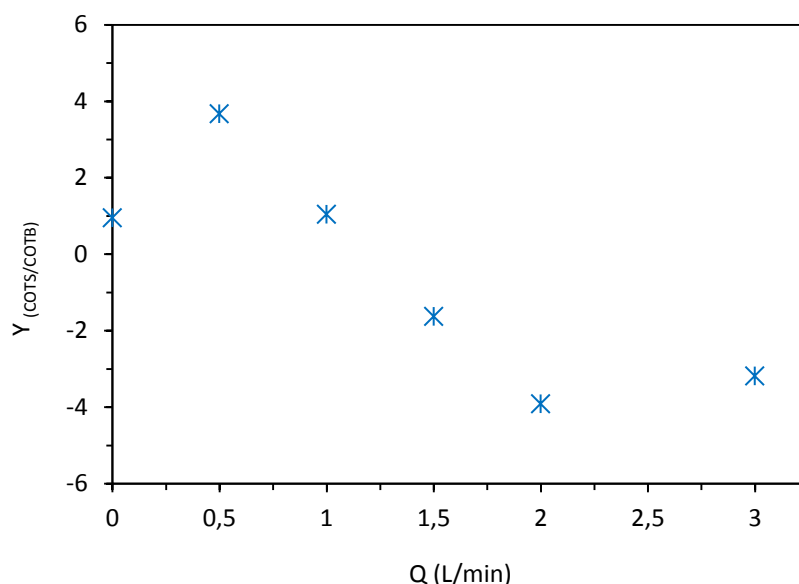


Figura V. 54. Rendimientos del COT eliminado o liberado del agua tratada (COT_s) por cada gramo de biomasa generado y calculado en base al carbono orgánico total (COT_B) para diferentes caudales de aireación. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ C$.

B.3. Biomasa (fango + nematodos)

La tabla V.15 recoge los valores de las constantes de degradación en base al COT y NT y la relación carbono orgánico total/nitrógeno total en la biomasa.

En general, en la serie experimental de aireación se ha registrado, durante la fase exponencial de crecimiento del nematodo, degradación de la biomasa total (fango + nematodos), donde la máxima degradación calculada en base a carbono orgánico total se ha determinado a un caudal de aire de 0,5 L/min con un valor para $K_{COT,B}$ de $2,09 \times 10^{-6}$ ($L \text{ mg}^{-1} h^{-1}$). Sin embargo, la máxima degradación de la biomasa en base al contenido en nitrógeno total, durante la misma fase de crecimiento del nematodo, ha sido determinada en para 0 y 0,5L/min registrando valores de las constantes de degradación del nitrógeno de $7,47 \times 10^{-6}$ y $6,84 \times 10^{-6}$ ($L \text{ mg}^{-1} h^{-1}$), respectivamente.

Tabla V. 15. Constantes de degradación de la biomasa en base a los contenidos en COT y NT en la biomasa total (fango + nematodos) durante la fase exponencial de crecimiento del nematodo.

Biomasa				
Q (L/min)	$K_{COT, B} \times 10^6$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	$K_{NT, B} \times 10^6$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²
0	0,823	0,964	7,47	0,914
0,5	2,09	0,969	6,84	0,958
1	1,77	0,969	5,56	0,985
1,5	1,77	0,960	4,00	0,769
2	1,32	0,994	3,41	0,917
3	0,854	0,991	1,76	0,996

En la figura V.55 se observa la tendencia de la variación de la constante de degradación de la biomasa total con el caudal de suministro de aire. Al incrementar el caudal de aire de 0 a 0,5 L/min se incrementa de forma brusca la constante de degradación en base al COT hasta su máximo; para luego ir disminuyendo hasta su valor mínimo de 0,854 (L mg⁻¹h⁻¹) a un caudal de 3 L/min. Sin embargo, en cuanto a la constante de degradación calculada en base de NT no se ha registrado un comportamiento similar. En este caso se observa una disminución lineal con el incremento de la velocidad de suministro de aire (Figura V.56).

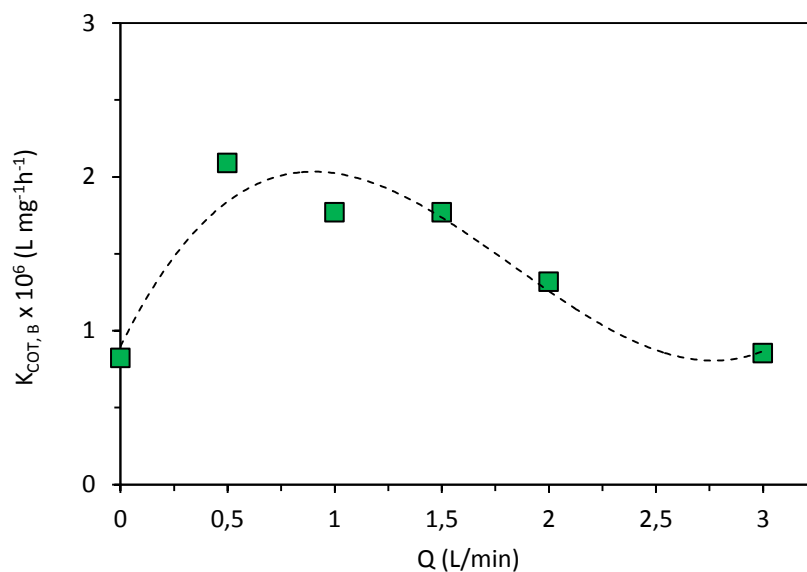


Figura V. 55. Constantes de degradación de la biomasa total calculada en base al COT ($K_{COT, B}$) para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \%$ (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

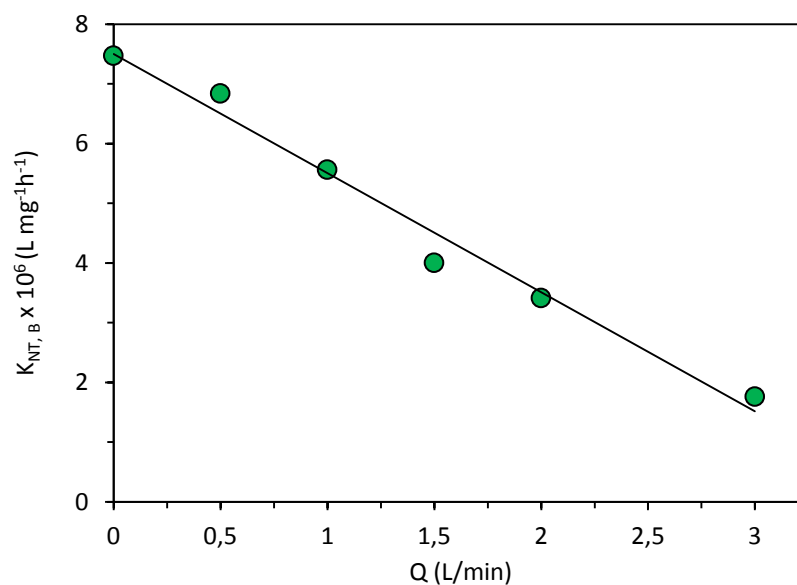


Figura V. 56. Constantes de degradación de la biomasa total calculada en base al NT ($K_{NT, B}$) para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \%$ (v/v), aireación = variable (L/min), agitación = 260 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

C) Efecto de la velocidad de agitación mecánica

La agitación mecánica permite homogeneizar el medio de cultivo; de hecho, es un parámetro crítico desde diversos puntos de vista. Por una parte, la agitación mecánica permite la aireación del medio de cultivo mediante el aumento de la superficie de contacto (aire-líquido) al incrementar la velocidad. Una agitación insuficiente puede producir zonas estancas en el reactor que eviten el total aprovechamiento de la materia orgánica presente en el fango. Otro factor a tener en cuenta es el posible estrés mecánico que puede sufrir *C. elegans*, por lo que un exceso de agitación puede afectar negativamente al crecimiento del nematodo provocando roturas del mismo. Finalmente, hay que señalar que la agitación mecánica conlleva un coste energético asociado por lo que de manera óptima, se aplicará una agitación mínima siempre y cuando no se comprometan el resto de factores anteriormente mencionados.

En cuanto a los antecedentes en este trabajo de investigación, se ha descartado la agitación mediante mosca magnética y aspas de tipo Rushton. Sin embargo, tanto las aspas tipo “U” como las de Hélice, han permitido crecimientos elevados de la población de nematodos. En esta serie experimental, se ha optado por utilizar el aspa tipo “U” por permitir trabajar a menor velocidad con más grado de mezcla, lo cual, a priori, disminuiría el estrés mecánico del nematodo y posiblemente los costes energéticos. Por lo tanto, se han llevado a cabo experimentos con diferentes velocidades de agitación (rpm) manteniendo constante: temperatura 20°C, concentración del fango 25% (v/v) y el caudal de aireación (1 L/min).

C.1. Efluente global

En todos los experimentos de la serie de agitación se ha observado que los contenidos en CT y COT disminuyen a lo largo del experimento. La figura V.57 muestra dicha variación en el experimento sin agitación. Como se puede observar se ha registrado una disminución más pronunciada durante la fase de crecimiento del nematodo (< 100 h) para luego mostrarse prácticamente constante. Durante la fase exponencial del crecimiento del nematodo se ha determinado la constante de degradación del COT correspondiente a una reacción de segundo orden (Figura V.58). Los valores más altos de la constante de degradación ($20,4 \times 10^{-7} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se han registrado a velocidad de agitación reducida (< 40 rpm), siendo el máximo valor en el cultivo sin agitación. Sin embargo, en cuanto a los porcentajes globales de eliminación de materia orgánica representada en base a COT, el valor más alto (32%) ha sido al operar a una agitación de 40 rpm (Tabla V.16).

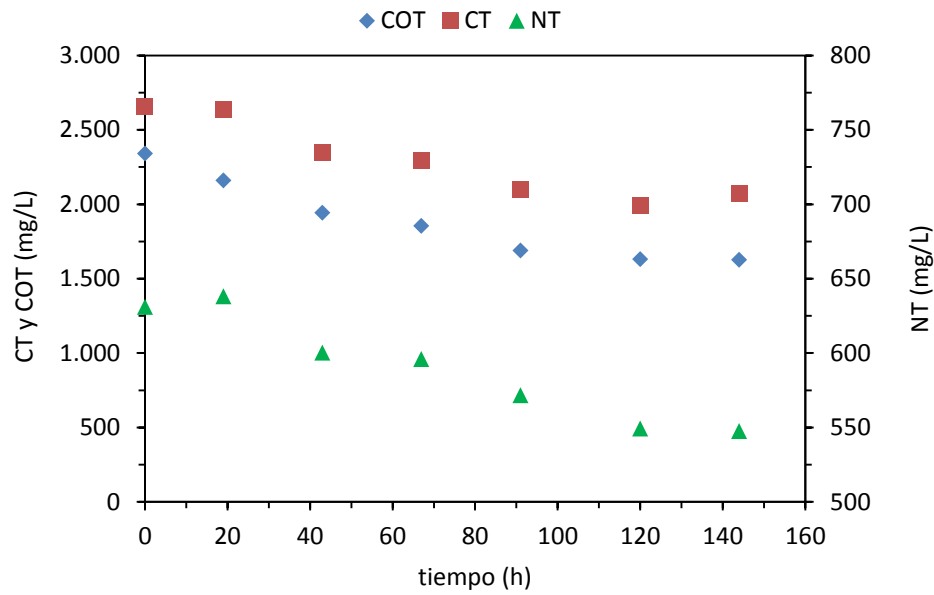


Figura V. 57. Variación de los contenidos en CT, COT y NT en el efluente global a lo largo del experimento sin agitación. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = 0 rpm y $T = 20^\circ\text{C}$.

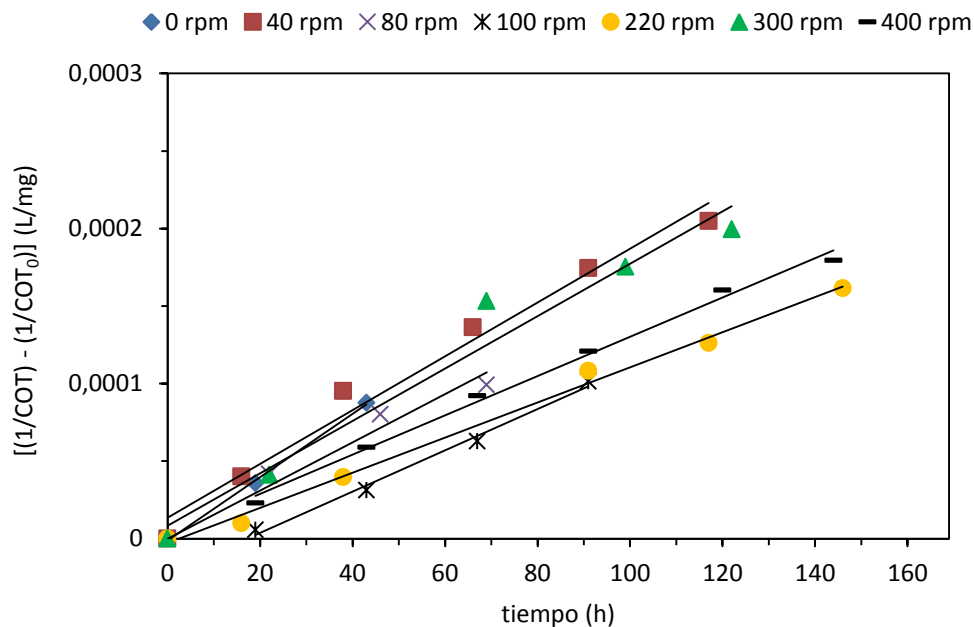


Figura V. 58. Representación gráfica, a diferentes velocidades de agitación, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

Tabla V. 16. Constantes de reacción (en base al COT y NT) y porcentajes de eliminación en el efluente global calculados al final de cada experimento.

Efluente global						
Agitación (rpm)	$K_{COT, EG} \times 10^7$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	COT _{eliminado} (%)	$K_{NT, EG} \times 10^6$ (L mg ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	NT _{eliminado} (%)
0	20,4	0,990	30,5	1,92	0,967	11,9
40	17,3	0,979	32,0	1,16	0,963	9,70
80	14,5	0,974	27,0	-2,54	0,439	1,08
100	13,3	0,992	18,4	-2,22	0,820	0,896
220	11,3	0,995	20,2	-4,20	0,988	-1,10
300	9,02	0,993	13,7	-7,29	0,999	-0,593
400	12,7	0,994	22,3	-2,86	0,952	-1,54

En las figuras V.59 y V.60 se puede observar que los valores de las constantes de degradación y los porcentajes de eliminación calculados en base al COT disminuyen de forma pronunciada al incrementar la agitación de 0 a 100 rpm. A velocidades de agitación superiores no se ha registrado una mejora en los valores mencionados anteriormente. Este hecho pone de manifiesto que el incremento de la agitación mecánica reduce la capacidad de degradación de este complejo sistema formado para la actividad de los microorganismos del fango y la depredación de *C. elegans*.

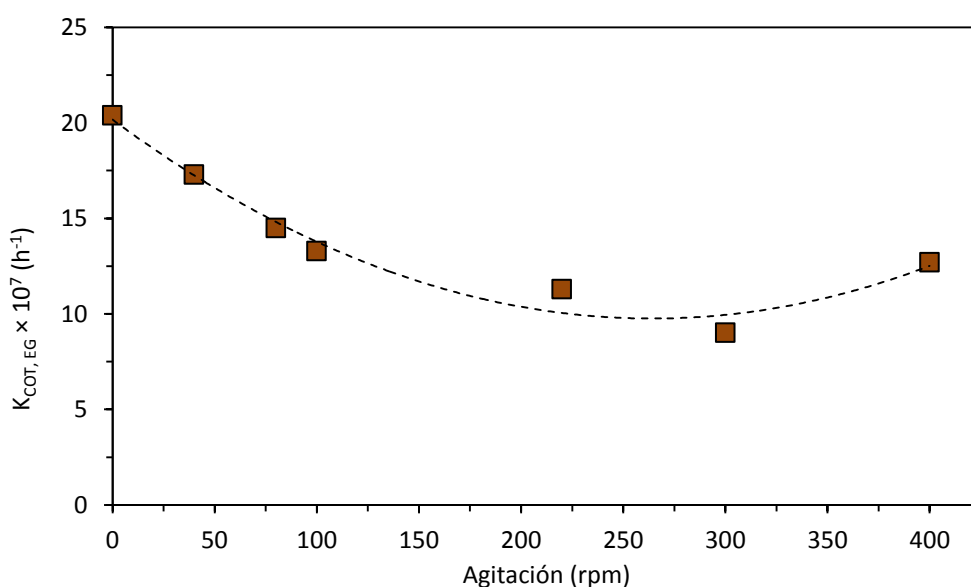


Figura V. 59. Variación de los valores de las constantes de degradación del contenido en COT en el efluente global para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y T = 20°C.

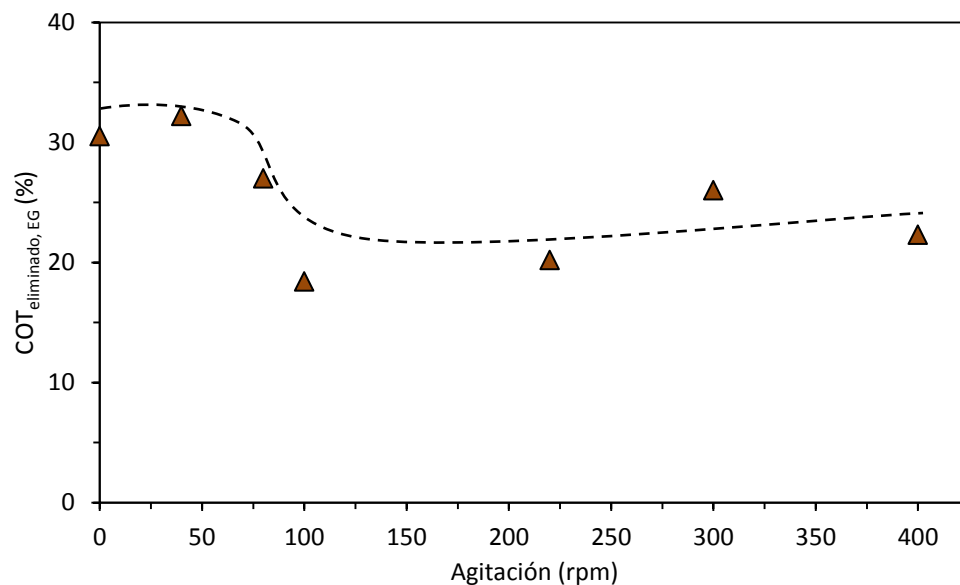


Figura V. 60. Porcentaje de eliminación del COT al final de cada experimento en el efluente global (%) para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

Además del carbono orgánico, se han estudiado las variaciones en la concentración de nitrógeno a lo largo del cultivo de *C. elegans*. La figura V.61 muestra la representación gráfica para el cálculo de las constantes de degradación/generación de nitrógeno para una ecuación de segundo orden.

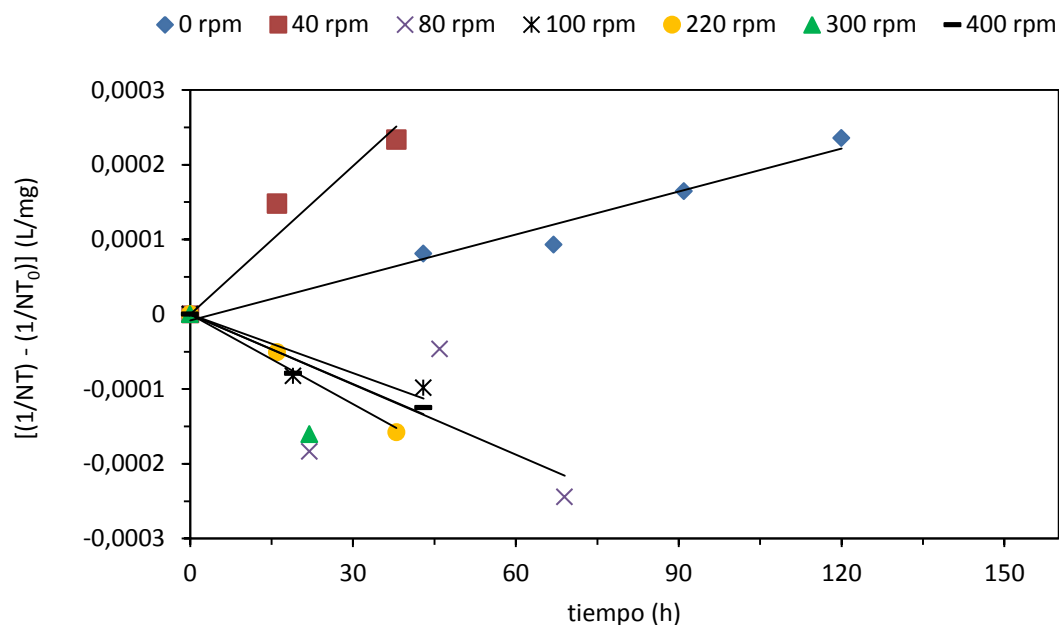


Figura V. 61. Representación gráfica, a diferentes velocidades de agitación, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el efluente global. Condiciones de operación: $[fango]_{inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^{\circ}C$.

Tanto las constantes de degradación (figura V.62) como los porcentajes de eliminación (figura V.63) calculados en base al contenido en nitrógeno total para el efluente global, muestran una caída pronunciada a partir de una agitación de 40 rpm; es decir, se genera NT; lo cual puede deberse a la mayor oxigenación que provoca un incremento en la velocidad de agitación y por tanto mayor actividad nitrificante del fango.

En este sentido, a velocidades de agitación superiores a 100 rpm, se incrementa la actividad aerobia del fango que se manifiesta mediante la fijación del nitrógeno atmosférico (proceso de nitrificación) considerando la existencia de las condiciones idóneas para ello; es decir, baja DQO y aireación continua del cultivo (Low y Chase, 1999a; Low y Chase, 1999b; Follett, 2001; Amanatidou et al., 2015). Además, de registrar la apariciones de NO_3+NO_2 en los medios de cultivo que han operado con una agitación superior a 80 rpm.

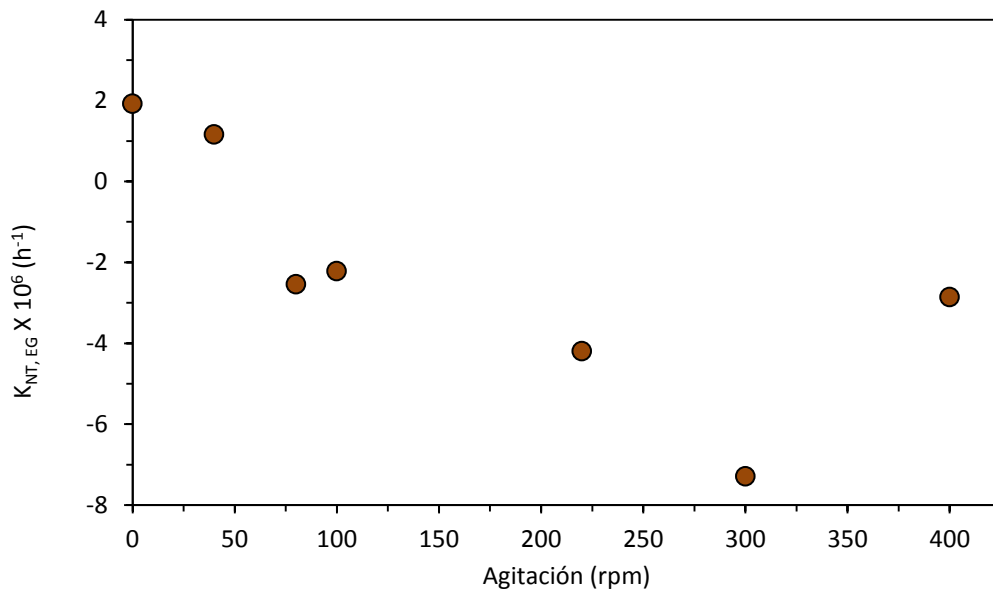


Figura V. 62. Constantes de degradación/generación calculadas en base a NT ($K_{NT, EG}$) en el efluente global para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ C$.

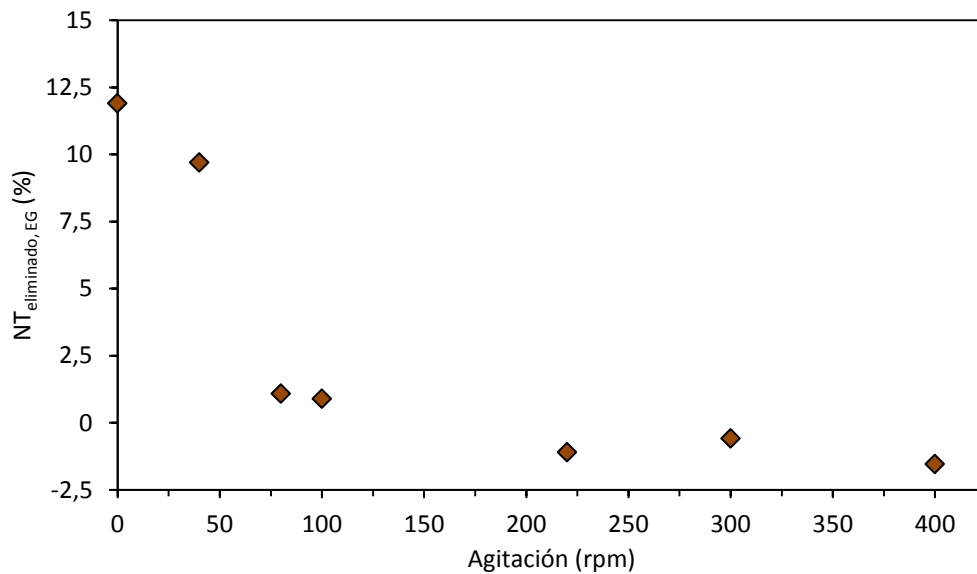


Figura V. 63. Porcentaje de eliminación del NT en el efluente global (%) al final de cada experimento para diferentes caudales de aireación ensayados. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ C$.

C.2. Agua tratada

En la figura V.64 se muestra la representación gráfica del cálculo de las constantes de degradación/generación de materia orgánica, en base al contenido en COT, para el agua tratada. En general, se observa degradación de la materia orgánica a todas las velocidades de agitación ensayadas. Por otra parte, se puede observar que las pendientes son muy próximas entre sí, lo que indica la baja influencia de la velocidad de agitación mecánica en la degradación de la materia orgánica en la fase del agua tratada. Aunque, existe una tendencia creciente suave (Figura V. 65) se puede considerar un valor medio para las constante de degradación ($K_{COT, s}$) igual a $21,2 \times 10^{-6}$ ($L \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), como se muestra en la tabla V.17.

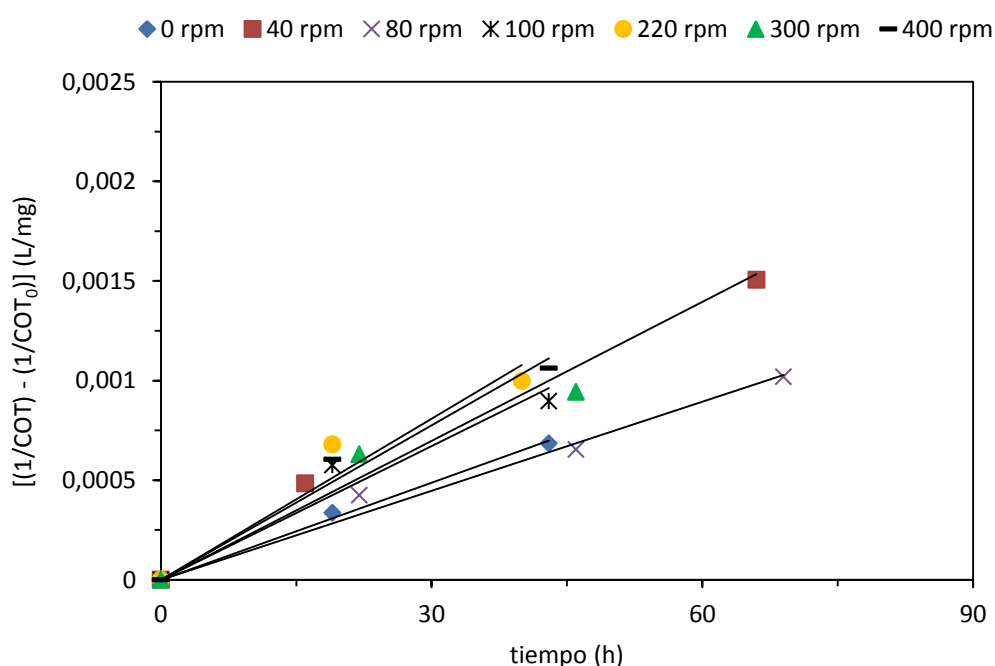


Figura V. 64. Representación gráfica, a diferentes velocidades de agitación, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al COT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el agua tratada. Condiciones de operación: $[fango]_{inicial} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

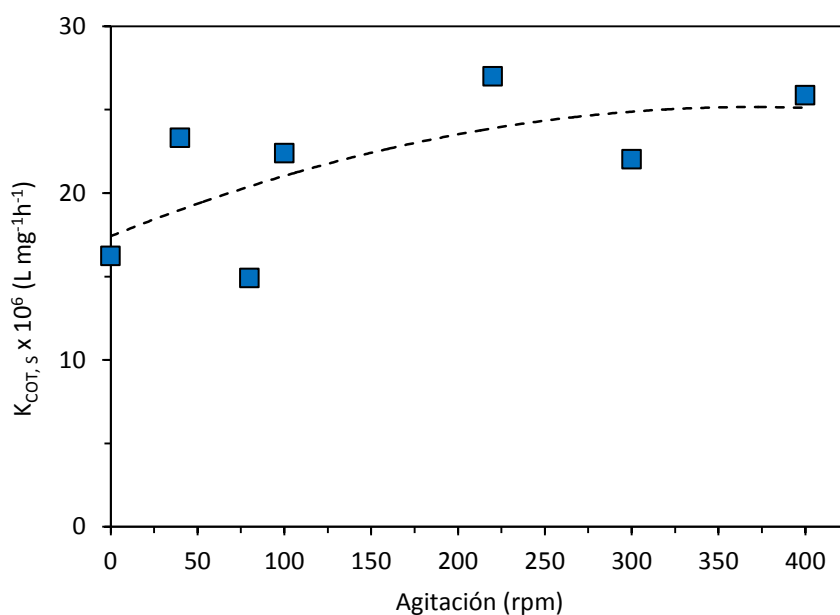


Figura V. 65. Variación de los valores de las constantes de degradación del contenido en COT en el agua tratada para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

La tabla V.17 recoge los valores determinados de la constante de degradación en base al COT y el NT, los porcentajes de eliminación del contenido en COT y NT y los rendimientos en COT eliminados del sobrenadante por cada gramo de biomasa generado.

Tabla V. 17. Constantes de degradación y porcentajes de eliminación del carbono orgánico total (COT) y del nitrógeno total (NT); y rendimiento de eliminación del COT en el sobrenadante respecto al COT generado en la biomasa. Datos para el agua tratada aplicando distintas velocidades de agitación.

Agua residual tratada								
Agitación (rpm)	$K_{COT,s} \times 10^6 \text{ (L mg}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$	R^2	COT _{eliminado} (%)	$K_{NT,s} \times 10^6 \text{ (L mg}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$	R^2	NT _{eliminado} (%)	$Y_{(COTS/COTB)} \text{ (g/g)}$	R^2
0	16,2	0,996	45,7	-17,9	0,985	-24,1	2,09	0,998
40	23,3	0,989	52,8	-10,8	0,878	-22,3	1,64	0,999
80	14,9	0,981	54,0	-8,12	0,995	-18,5	1,11	0,943
100	22,4	0,935	52,8	-8,96	0,972	-18,0	1,00	0,970
220	18,4	0,989	56,2	-6,44	0,945	-14,2	0,856	0,972
300	27,0	0,944	54,2	-6,95	0,917	-18,0	0,983	0,938
400	25,9	0,973	58,5	-14,8	0,999	-16,9	0,818	0,940

La figura V. 66 muestra los porcentajes de eliminación del COT en función de la velocidad de agitación aplicada en cada experimento. Donde se detecta que la calidad del agua tratada mejora al incrementar la velocidad de agitación.

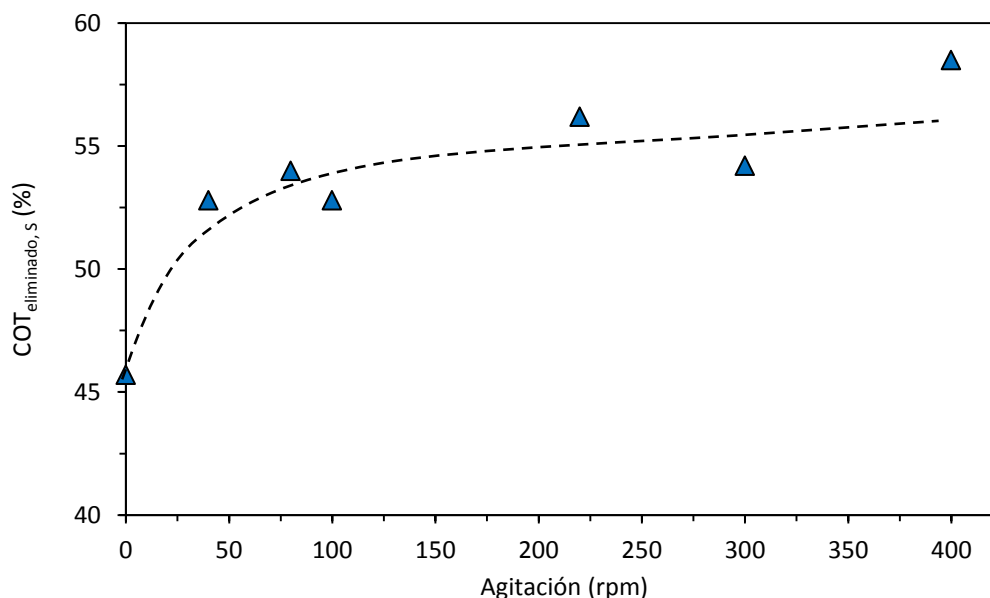


Figura V. 66. Porcentaje de eliminación del COT en el agua tratada (%) al final del experimento para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y T = 20°C.

La mejora registrada en la calidad del agua residual es esperable considerando que el nematodo y el propio fango con sus actividades reducen la carga orgánica y los nutrientes minerales en el agua tratada. También, se debe recordar que la fase clara, en este trabajo, se ha obtenido por centrifugación lo que implica mayor grado de separación de los componentes y mayor calidad del agua tratada. Hecho, que puede ser no representativo en el caso de escalar el proceso al no utilizar la centrifugación como una operación de separación (como por ejemplo decantación natural).

En la figura V.67 se muestra gráficamente el cálculo de las constantes de generación de nitrógeno registradas durante las fases Lag y exponencial del crecimiento de *C. elegans*. Desde las primeras horas del cultivo se observa un incremento en la concentración de nitrógeno en la fase líquida (el agua tratada) indicando la degradación del fango produciendo la transferencia de compuestos nitrogenados a la fase líquida (principalmente degradación de proteína unicelular). También, se puede concluir que la constante de generación de nitrógeno se reduce con el aumento de la velocidad de agitación. En otras palabras, en la fase acuosa se produce mayor generación de nitrógeno a velocidades de agitación baja (< 100 rpm).

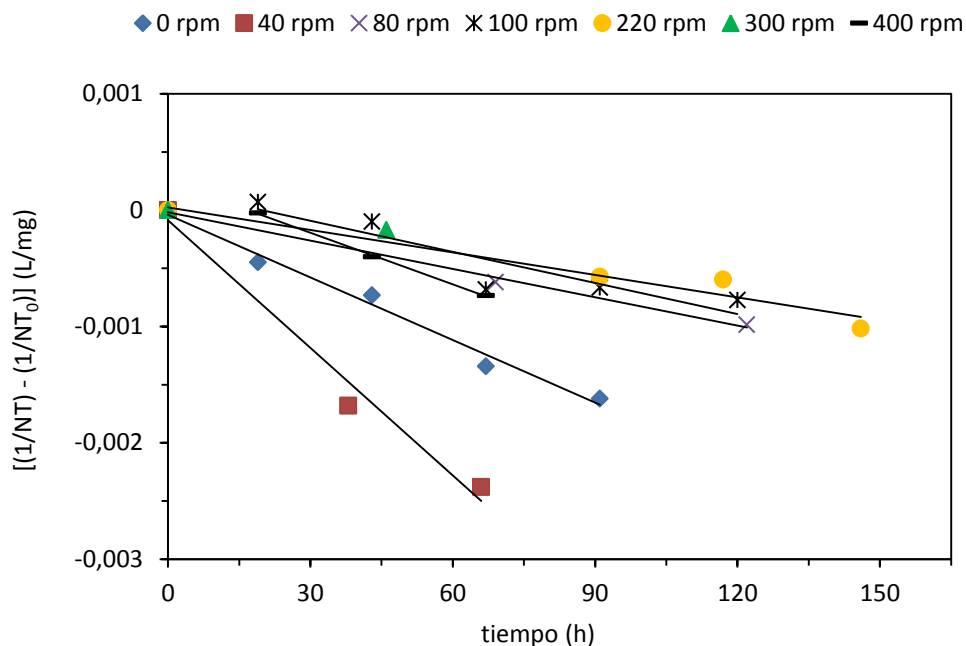


Figura V. 67. Representación gráfica, a diferentes velocidades de agitación, del ajuste matemático a una ecuación de segundo orden (en base al NT) durante las fases Lag y exponencial del crecimiento del nematodo. Datos para el agua tratada. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

La figura V. 68 muestra como varían las constantes de generación de nitrógeno con el incremento de la velocidad de agitación del medio de cultivo.

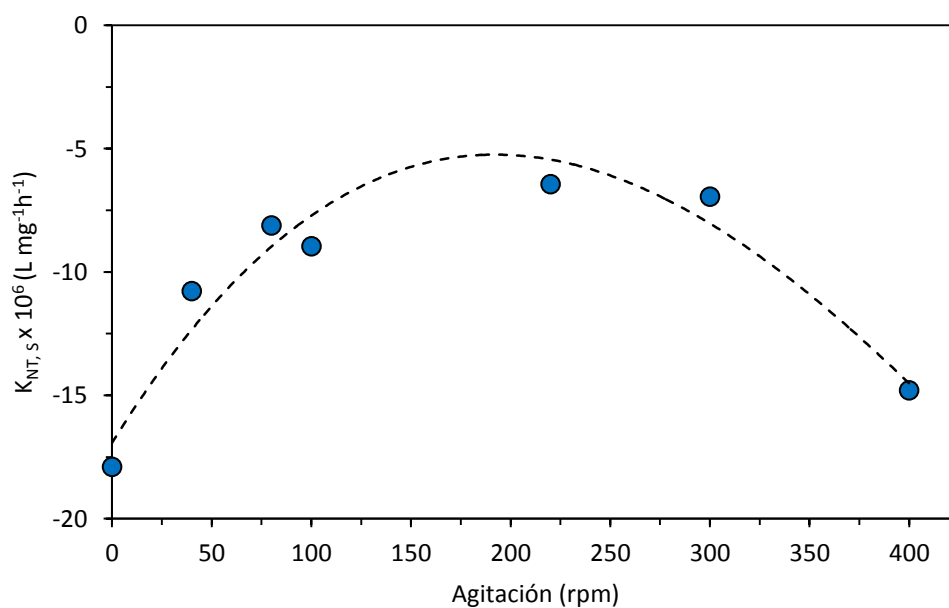


Figura V. 68. Constantes de generación en el agua tratada calculadas en base al NT ($K_{NT,s}$) para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

La velocidad de generación de nitrógeno en la fase líquida se reduce con el incremento de la velocidad de agitación, registrando su máximo entre 100 y 200 rpm. Este hecho, es consistente con el comportamiento de las velocidades de crecimiento máximas y productividades en biomasa registradas para el nematodo, donde la velocidad específica se incrementa con el aumento de la velocidad de agitación y la productividad en la biomasa de nematodo se mantiene constante hasta 220 rpm para luego disminuir. En otras palabras, al incrementar la velocidad de agitación mecánica se observa aumento de la velocidad específica de crecimiento del nematodo e incremento de la biomasa microbiana. Por tanto, se produce un efecto de reducción de la transferencia de nitrógeno que es liberado desde la biomasa hacia la fase líquida, hasta alcanzar las 220 rpm para luego combinar el efecto del nematodo (depredación de bacterias) con el efecto de lisis celular por alta agitación; implicando mayor liberación de compuestos nitrogenados a la fase líquida como se observa en los valores de las constantes de generación de nitrógeno a 300 y 400 rpm (Figura V.68).

En la figura V.69 se muestra la variación del porcentaje de eliminación de nitrógeno frente al incremento de la velocidad de agitación del medio de cultivo.

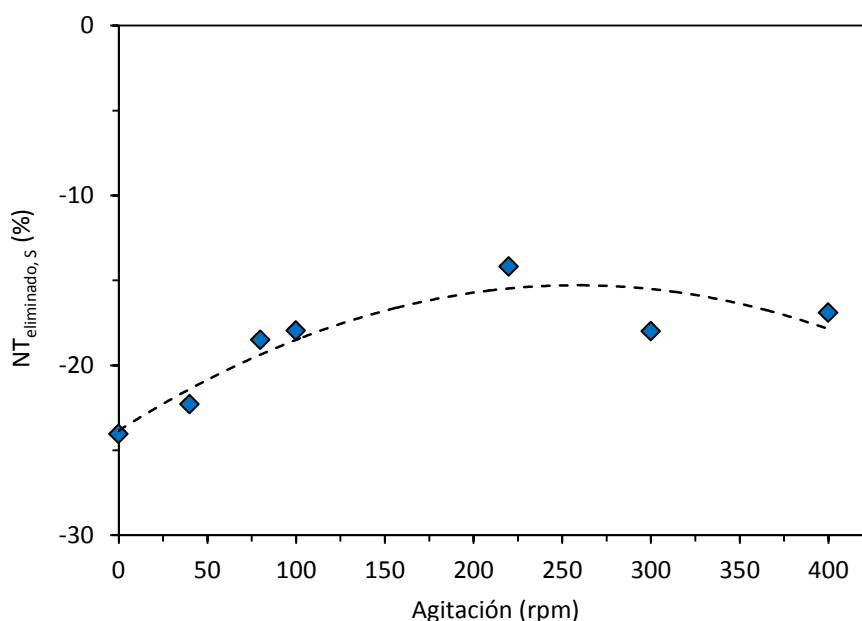


Figura V. 69. Porcentaje de eliminación del NT en el agua tratada (%) al final de cada experimento para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: $[fango]_{inicial} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

En general, y en todos los experimentos de la serie de agitación, se ha incorporado nitrógeno a la fase líquida (valores negativos del %NT eliminado). Pero dicho nitrógeno se incorpora en menor medida en la fase de agua tratada al incrementar la velocidad de agitación hasta 220 rpm; para agitaciones mayores, se

observa un aumento del porcentaje de nitrógeno incorporado a la fase líquida. Este hecho puede ser explicado considerando el aumento de la biomasa microbiana con el incremento de la velocidad de agitación y también el incremento de la incorporación del nitrógeno a la biomasa del nematodo conforme aumenta la agitación mecánica (las velocidades específicas máximas de crecimiento del nematodo aumentan con la agitación). Para luego incrementar el nitrógeno liberado hacia la fase de agua tratada por el efecto de la degradación microbiana tanto por la actividad de los nematodos como por la lisis celular; a consecuencia mayores velocidades de agitación.

Por último, se ha determinado el rendimiento del COT del agua tratada respecto al COT de la biomasa (Figura V.70). En este caso sí se muestra un comportamiento dependiente de la velocidad de agitación. El valor máximo se obtiene en ausencia de agitación mecánica con un valor de 2,09 g de COT_S/g de COT_B ; lo cual significa que por cada gramo de biomasa (fango + nematodos) que se genera, se eliminan 2,09 gramos del COT del sobrenadante y, por tanto, la calidad del agua residual tratada será mayor con una menor formación de biomasa final. En relación al incremento de la velocidad de agitación, se observa una disminución del valor de este rendimiento hasta 1 g de COT_S/g de COT_B obtenido para 100 rpm; a partir de esta velocidad, y hasta 400 rpm, la fluctuación en este parámetro es mínima. Este hecho puede explicarse considerando que el nematodo alcanza su máxima velocidad específica de crecimiento para velocidades de agitación superiores a 100 rpm, lo que implica mayor necesidad de nutrientes para generar su biomasa, algo similar lo manifiesta la biomasa microbiana que adquiere nutrientes de la fase líquida para sostener su crecimiento celular.

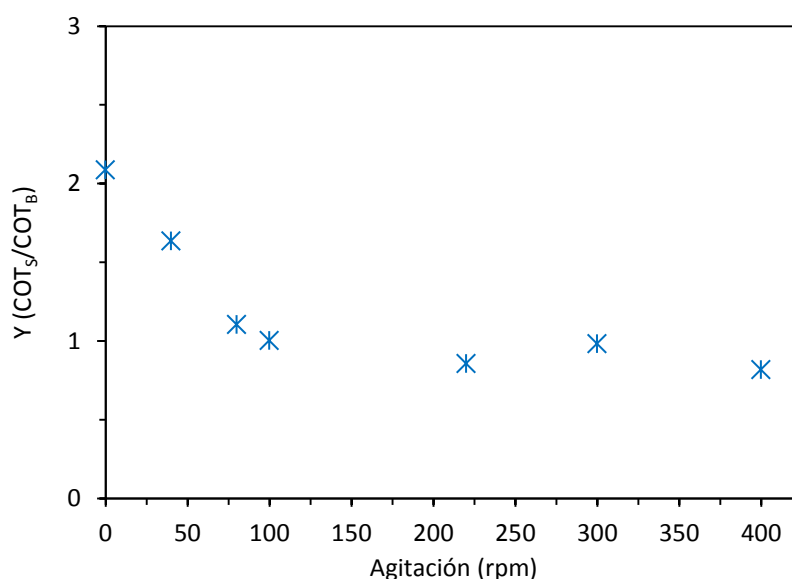


Figura V. 70. Rendimiento del COT eliminado del agua tratada (COT_S) respecto al COT generado en la biomasa (COT_B) para diferentes velocidades de agitación. Condiciones de operación: $[fango]_{Inicial} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

C.3. Biomasa global (fango + nematodo)

En general, todos los experimentos han mostrado un aumento de la biomasa global en las primeras 20-40 h de cultivo para luego disminuir hasta el final del experimento. Este aumento inicial de la biomasa es normal considerando que en las primeras horas el nematodo se encuentra en fase Lag (biorreactor en discontinuo) y la condición aerobia del cultivo, lo que implica un incremento de la biomasa global. De hecho, inicialmente la biomasa crece a partir de los nutrientes presentes en la fase líquida hasta que la población de *C. elegans* alcanza un número elevado actuando como depredador bacteriano y, posiblemente, también se produzca lisis celular de los microorganismos como consecuencia de una elevada oxigenación y restricción de nutrientes. La figura V.71 muestra la variación de los parámetros CT, COT y NT de la biomasa a lo largo del cultivo a 400 rpm.

Las constantes de degradación de la biomasa ($K_{COT, B}$ y $K_{NT, B}$) se han calculado a tras el incremento inicial de la biomasa (después de 20-40 h de cultivo). En todos los experimentos, la degradación de la biomasa se ha ajustado a una ecuación de segundo grado.

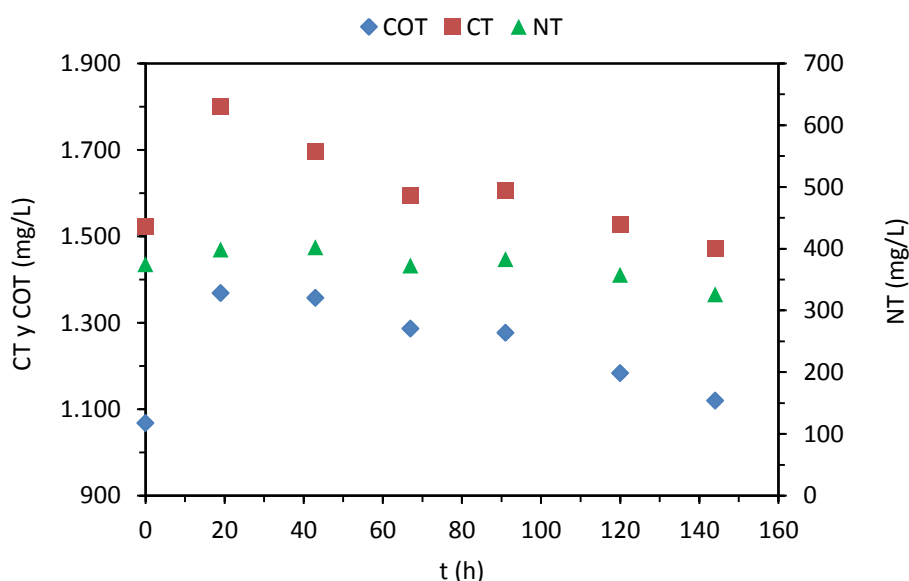


Figura V. 71. Variación de los contenidos en CT, COT y NT de la biomasa global (fango + nematodo) a lo largo del experimento a 400 rpm. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{inicial}} = 25\%$ (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = 400 rpm y $T = 20^{\circ}\text{C}$.

La tabla V.18 muestra las constantes de degradación, porcentajes de eliminación del carbono orgánico total (COT) y del nitrógeno total (NT); y rendimiento de nitrógeno respecto a la biomasa. En general, el balance global de los cultivos, al estudiar el efecto de la velocidad de agitación mecánica, es generación de biomasa

menos cuando se opera a 40 rpm. Sin embargo, las constantes de degradación calculadas en base al COT después de las primeras 20-40 h de cultivo tienen valor positivo (Figura V. 72) indicando que la agitación del fango en presencia de nematodo implica una reducción en la biomasa y no un incremento como es de esperar en condiciones aerobias de cultivo.

Tabla V. 18. Constantes de degradación, porcentajes de eliminación del carbono orgánico total (COT) y del nitrógeno total (NT); y rendimiento de nitrógeno generado por cada gramo de biomasa calculada a base de COT_B . Datos para la biomasa global obtenidos a distintas velocidades de agitación.

Biomasa								
Agitación (rpm)	$K_{COT, B} \times 10^6$ ($L\ mg^{-1}h^{-1}$)	R^2	COT_{elim} (%)	$K_{NT, B} \times 10^6$ ($L\ mg^{-1}h^{-1}$)	R^2	$Y_{(NTB/COTB)}$ (g/g)	R^2	NT_{elim} (%)
0	2,40	0,989	-12,5	9,01	0,986	0,358	0,991	12,5
40	1,55	0,991	20,7	6,32	0,949	0,330	0,922	35,5
80	2,64	0,968	-17,7	6,96	0,778	0,345	0,929	6,85
100	2,16	0,996	-18,4	7,67	0,939	0,343	0,993	9,94
220	1,87	0,880	-16,7	6,44	0,980	0,354	0,985	6,68
300	1,75	0,610	-10,7	4,52	0,999	0,316	0,961	4,71
400	1,31	0,932	-11,7	3,86	0,939	0,233	0,979	5,13

Por otra parte, cabe resaltar que en todos los experimentos realizados en la serie de agitación mecánica se han determinado valores positivos para el $K_{NT, B}$ (Figura V.73) y $\%NT_{eliminado}$, indicando la eliminación del nitrógeno de la biomasa global; registrando un porcentaje máximo en el cultivo que opera a 40 rpm (Tabla V.18). Este hecho puede ser justificado considerando la desnitrificación de la biomasa liberando nitrógeno y, de hecho, se han detectado concentraciones de NO_3 y NO_2 en algunos experimentos (40, 80, 220 y 300 rpm) de la serie de agitación mecánica. En este sentido, algunos autores han indicado que algunas bacterias pueden desnitrificar en condiciones aerobias como es el caso de *Magnetospirillum magnetotacticum* que consume O_2 mientras desnitrifica (Bazylinski y Blakemore, 1983). Aquí cabe resaltar que el medio de cultivo que se maneja es muy complejo, denso y la aireación que se lleva a cabo es por burbujeo por lo que podría tener zonas donde la transferencia o difusión del oxígeno no es adecuada.

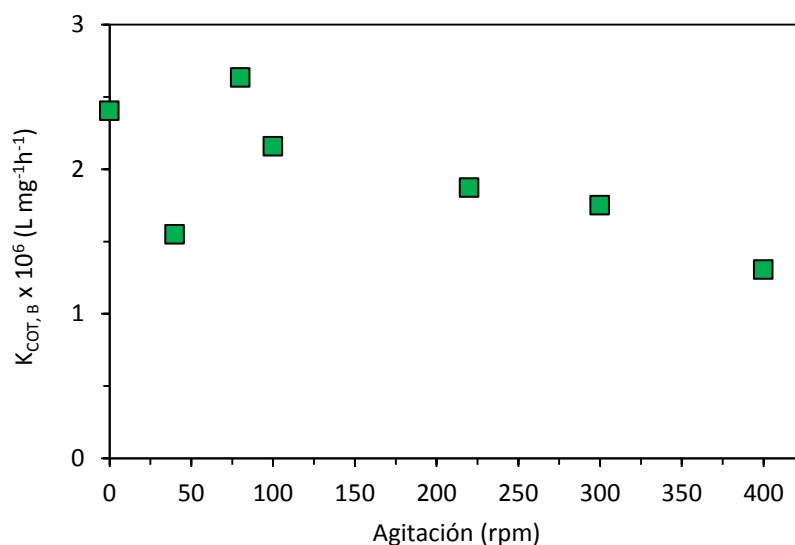


Figura V. 72. Variación de los valores de las constantes de degradación del contenido en COT en la biomasa global para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y T = 20°C.

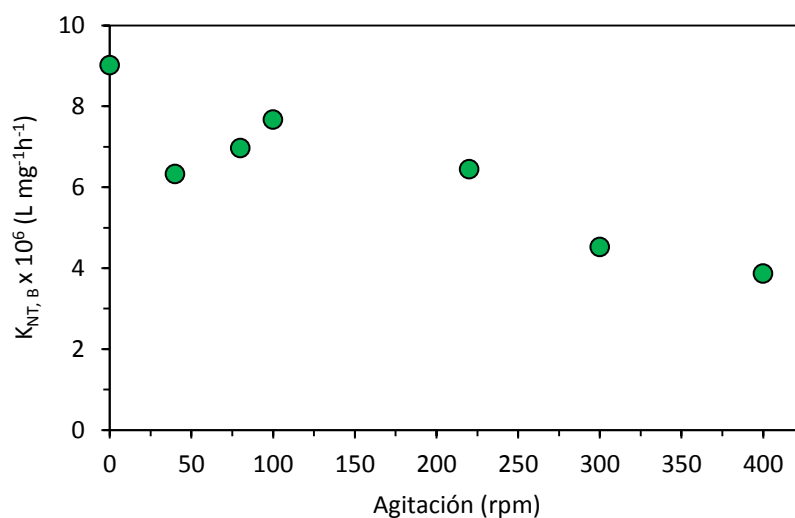


Figura V. 73. Variación de los valores de las constantes de degradación del contenido en NT en la biomasa global para diferentes velocidades de agitación ensayadas. Condiciones de operación: [fango]_{Inicial} = 25 % (v/v), aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y T = 20°C.

Por último, la tendencia de los rendimientos de nitrógeno incorporado a la biomasa respecto a la biomasa generada y calculado en base al COT, se muestra en la figura V.74. Dicho rendimiento se mantiene prácticamente constante (0,346 g/g) hasta 220 rpm para después disminuir de forma brusca indicando la liberación del nitrógeno, sea en forma molecular N₂ o como compuestos nitrogenados a la fase líquida.

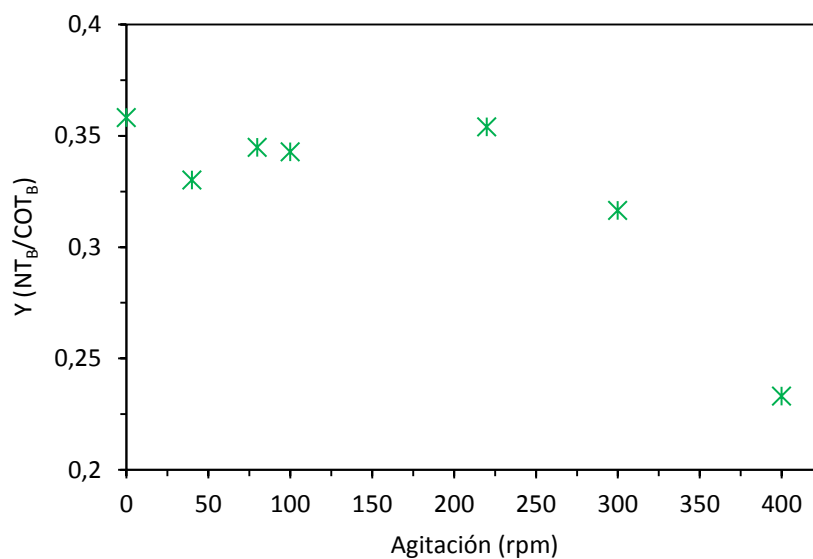


Figura V. 74. Rendimiento del NT incorporado/liberado a la biomasa respecto a la biomasa global generada y calculada en base al COT para diferentes velocidades de agitación. Condiciones de operación: $[\text{fango}]_{\text{Inicial}} = 25 \text{ \% (v/v)}$, aireación = 1 L/min, agitación = variable (rpm) y $T = 20^\circ\text{C}$.

V.2.3.4. Reducción global en la materia orgánica del fango

En la tabla V.19, se recogen los resultados de los porcentajes de degradación del efluente global, obtenidos en las diferentes series experimentales desarrolladas a nivel de biorreactores y calculados en base a los sólidos volátiles (materia orgánica). También se muestran los porcentajes de reducción en los valores de DQO de la fase líquida obtenida después de la separación del fango.

Tabla V. 19. Porcentajes de reducción de la materia orgánica (SV = sólidos volátiles) del efluente global y de la demanda química del oxígeno (DQO) en la fase líquida (agua tratada) determinados al final de cada experimento (Exp.).

		Condiciones de operación comunes			Efluente global	Fase líquida (agua tratada)
Serie	Exp.	Fango (% v/v)	Aireación (L/min)	Agitación (rpm)	Reducción de SV (% b.s)	Reducción de DQO (%)
[Fango]_{Inicial}	B1 (SIN NEM)	25	2	260	8,42	34,7
	B2	25	2	260	21,0	-
	B3	35	2	260	12,4	-
	B4	50	2	260	-	-
	B5	60	2	260	-	-
	B6	75	2	260	11,3	-
Aireación	B7	25	0	260	13,5	51,3
	B8	25	0,5	260	22,5	65,1
	B9	25	1	260	21,4	54,4
	B10	25	1,5	260	14,2	25,1
	B11	25	2	260	17,6	23,1
	B12	25	3	260	11,0	9,1
Agitación	B13	25	1	0	22,1	58,2
	B14	25	1	40	24,2	59,3
	B15	25	1	80	22,7	48,2
	B16	25	1	100	23,6	56,2
	B17	25	1	220	21,5	61,5
	B18	25	1	300	21,0	39,9
	B19	25	1	400	24,2	56,8

Estos resultados mantienen tendencias similares a los porcentajes de eliminación en el efluente global obtenidos a partir del COT. El porcentaje más alto de eliminación de sólidos volátiles (21,0% en base seca) se ha registrado cuando se ha operado a una concentración de fango inicial del 25% (v/v) y en presencia del nematodo; mientras que en ausencia del nematodo la reducción de sólidos volátiles ha sido del 8,42%; lo cual indica evidencias de la aportación del nematodo en la reducción

de la materia orgánica del fango. En el caso de la serie de aireación, el caudal de aire que más ha favorecido la eliminación de la materia orgánica (21,4-22,5%) se ha determinado al utilizar un caudal de aire entre 0,5 y 1 L/min. Este mismo caudal de aire ha registrado el máximo porcentaje de eliminación de la DQO (54,4-65,1%) en la fase líquida (agua tratada). Al variar la velocidad de la agitación mecánica en el biorreactor no se han registrado diferencias apreciables, siendo los porcentajes de eliminación máximos %SV = 24,2% y %DQO = 59,3 % en el efluente global y el agua tratada, respectivamente. Dichos porcentajes se han alcanzado al aplicar una velocidad de agitación de 40 y 400 rpm.

V.3. Producción de materia grasa

Además de la reducción del fango como residuo, otro objetivo de este trabajo de investigación es obtener materia grasa que permita incrementar la rentabilidad económica del proceso. En la tabla V. 20 se recogen los porcentajes de materia grasa total obtenidos al inicio y final de los experimentos desarrollados en los biorreactores.

Tabla V. 20. Porcentajes de materia grasa total (fango + nematodos) en fango del espesador secundario al inicio y al final de cada experimento tras el cultivo de *C. elegans* calculados en base seca (b.s).

Serie	Exp.	Condiciones de operación comunes			Materia grasa	
		[Fango] (%, v/v)	Aireación (L/min)	Agitación (rpm)	Inicial (% b.s)	Final (% b.s)
[Fango]_{inicial}	B0 (SIN NEM)	25	2	260	0,993	3,60
	B1	25	2	260	0,993	1,55
	B2	25	2	260	0,993	3,03
	B3	35	2	260	0,993	1,64
	B4	50	2	260	-	-
	B5	60	2	260	0,993	1,36
	B6	75	2	260	0,993	0,424
Aireación	B7	25	0	260	2,36	0,614
	B8	25	0,5	260	2,36	0,282
	B9	25	1	260	2,36	2,152
	B10	25	1,5	260	1,67	5,07
	B11	25	2	260	1,67	5,10
	B12	25	3	260	2,36	6,57
Agitación	B13	25	1	0	0,726	1,83
	B14	25	1	40	0,672	0,787
	B15	25	1	80	1,67	0,825
	B16	25	1	100	0,726	1,76
	B17	25	1	220	0,672	0,888
	B18	25	1	300	1,674	2,69
	B19	25	1	400	0,726	0,278

Como se puede observar, los porcentajes de materia grasa totales obtenidos han variado en el rango de 0,278% a 6,57% (en peso seco). Los porcentajes más altos de materia grasa se han obtenido en los cultivos que han operado con un caudal de aire superior a 1,5 L/min. Sin embargo, no parece existir una relación directa entre la obtención de altos porcentajes de materia grasa y elevados porcentajes de degradación de fango. Por otra parte, hay que recordar que las EDARs tienen grandes problemas con la cantidad de fangos generados lo que pone de manifiesto la

necesidad de establecer prioridades a la hora de planificar operar de una forma u otra. Con los resultados registrados hasta el momento, el beneficio que se obtendría mediante la reducción de fango por la actividad depredadora del nematodo es una realidad; sin embargo, habrá que ajustar los parámetros de operación para que se obtengan de manera conjunta los dos objetivos: máxima reducción de fango y máxima cantidad de materia grasa de nematodo.

Por otra parte, los porcentajes de materia grasa registrados en los biorreactores no son muy elevados (máximo = 6,57% b.s); sin embargo, hay que señalar que las medidas se han realizado al final del cultivo, cuando la población de nematodos ha descendido considerablemente y probablemente no se obtenga el máximo porcentaje de lípidos. En consecuencia, se han estudiado otras estirpes de *C. elegans* y diferentes estadios poblacionales en medios de cultivo de control (*E. coli*). Los máximos porcentajes de materia grasa alcanzados (10,2% y 10,8 %) fueron obtenidos al utilizar *C. elegans* de la estirpe N2 con estadios poblacionales donde predomina la larva dauer (65%) y adultos (5%) y la estirpe *daf-2(e1370)* donde predomina la larva dauer (80%), respectivamente.

En consecuencia, el contenido de materia grasa se puede incrementar sincronizando la población de nematodos para realizar la extracción con una mayor proporción adultos; lo cual se apoya en otros estudios que muestran que los adultos tienen un mayor contenido de triglicéridos que los cuatro estadios larvarios (Zhang et al., 2011). Otra alternativa, es utilizar mutantes obesos o mediante la inducción de la larva dauer por su mayor cantidad de materia grasa (Witting y Schmitt-Kopplin, 2016; Wadsworth y Riddle, 1989; O’Riordan y Burnell, 1989). La formación de dauer puede llevarse a cabo mediante condiciones de estrés como el aumento de temperatura o la escasez de alimento (Albert y Riddle, 1988; Cassada y Russell, 1975; Sulston y Hodgkin, 1988). También se induce si existe una elevada densidad poblacional de nematodos mediante la detección de feromonas (Hu, 2007); por tanto, puede generarse de manera controlada a través del uso de feromonas e incluso con la modificación de la temperatura o la concentración de nutrientes. De hecho, en la extracción de materia grasa realizada a poblaciones en las cuales el 65% de los nematodos son larva dauer y el 5% de adultos, se ha determinado que el 10,8% del peso seco del nematodo es materia grasa, siendo el mayor porcentaje obtenido.

Por otra parte, se ha observado que los nematodos, en medio líquido, mantienen una elevada movilidad que puede causar una gran pérdida de energía, es posible que mutantes con movilidad reducida puedan permitir un incremento del contenido lipídico. De hecho, Laranjeiro R. et al., demostraron que el medio líquido para el nematodo es semejante a simular una actividad física en humanos, en cuanto a un mayor consumo de lípidos y la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo (Laranjeiro et al., 2017).

Por tanto, se han realizado cultivos de nematodo en su medio de referencia S-Medio de las estirpes de nematodo silvestre (N2) y cuatro mutantes: dos mutantes obesos como son *daf-2 (e1370)* e *ire-1 (v33)* y dos mutantes de movilidad reducida, *unc-31 (e169)* y *mod-1 (ok103)* (Wormbase, 2017). Los resultados obtenidos con estas estirpes para poblaciones en saturación no han mostrado resultados superiores al silvestre, sin embargo, sí se observa un mayor porcentaje de materia grasa cuando existe la predominancia de larva dauer o estadios adultos como 10,2-10,8% para el mutante *daf-2 (e1370)* y el silvestre. Está descrito que el estadio de resistencia dauer tiene una menor actividad de las enzimas implicadas en la β -oxidación de los lípidos (O’Riordan y Burnell, 1989; O’Riordan y Burnell, 1990).

Una de las ventajas de la utilización del nematodo *C. elegans*, es que ya existe una enorme colección de mutantes obesos y de movilidad que pueden ser estudiados. Además de los mutantes ya ensayados, otros candidatos son las estirpes *k1f-3 (ok1975)* y *F08A8.1 (ok2257)*; estos nematodos están afectados en la ruta metabólica de la β -oxidación de los ácidos grasos; es decir, no tienen la capacidad de degradación de sus propia materia grasa y está reportado que acumulan un mayor contenido lipídico (Zhang et al., 2011).

Además, mediante cruces sexuales pueden generarse dobles mutantes que agrupen dos o más características de interés como la obesidad y la ausencia de movilidad, en este caso; con lo cual es una herramienta útil para el objetivo de incrementar la acumulación de lípidos.

En conclusión, será necesaria la experimentación de una mayor batería de mutantes con el objetivo de incrementar el contenido de materia grasa producido en el proceso. Además, estos mutantes deben ser estudiados en condiciones de predominancia de dauer o estadios adultos.

La materia grasa obtenida a partir de la biomasa del fango más nematodo puede emplearse como materia prima para la producción de biodiésel, lubricantes o bioplásticos, etc. en el caso de que sea extraída de la biomasa global. Además, una vez separada la materia grasa, se podría dirigir la biomasa resultante al digestor anaerobio siendo muy interesante estudiar su potencial en la producción de biogás ya que se trata de biomasa ya digerida por el nematodo; de hecho, Hendrickx et al., (2010a) muestra que el fango digerido por oligoquetos tiene un mayor potencial para la producción de biogás en el tratamiento anaerobio.

Además, es importante indicar la necesidad de la identificación del perfil de ácidos grasos de la materia grasa separada para prever la calidad de biodiésel a generar a posteriori. En este caso, como se trata de una biomasa de composición compleja (fango + nematodos) no se puede identificar la materia grasa procedente del fango y la que procede del nematodo al ser una extracción del conjunto de la biomasa.

Con el objetivo de determinar la calidad de la materia grasa obtenida a partir de los cultivos de nematodo, se ha determinado el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica mediante cromatografía de gases para nematodos crecidos a base de fango y *E. coli* (Figura V.75). El perfil de ácidos grasos obtenido a partir de biomasa de *C. elegans* crecida en fango o en *E. coli* es similar, donde los ácidos grasos mayoritarios son esteárico (C18:0), vacínico (C18:1n7), linoleico (C18:2n6), dihomo- γ -linolénico (C20:n6), araquidónico (C20:4n3) y EPA (C20:5n3) cuyas proporciones ascienden al 9,13%, 25,1%, 5,92%, 6,22%, 10,3% y 23,2% para nematodos crecidos a partir de biomasa de fango frente al 9,69%, 9,27 %, 9,20%, 9,58%, 9,5% y 27,5% para nematodos crecidos en biomasa de *E. coli*, respectivamente. En este sentido la presencia del ácido vacínico puede deberse a la existencia de condiciones de infección, las cuales son bastante probables en la biomasa del fango; aunque hay estudios que sugieren que la causa puede ser simplemente por una diferencia en la dieta del nematodo, independientemente de que las condiciones sean patógenas o no (Nandakumar y Tan, 2008). En general, el perfil de ácidos grasos presenta ácidos grasos de C10 hasta C20; lo cual es, relativamente, cadena corta y pueden ser de interés para la producción de biodiésel.

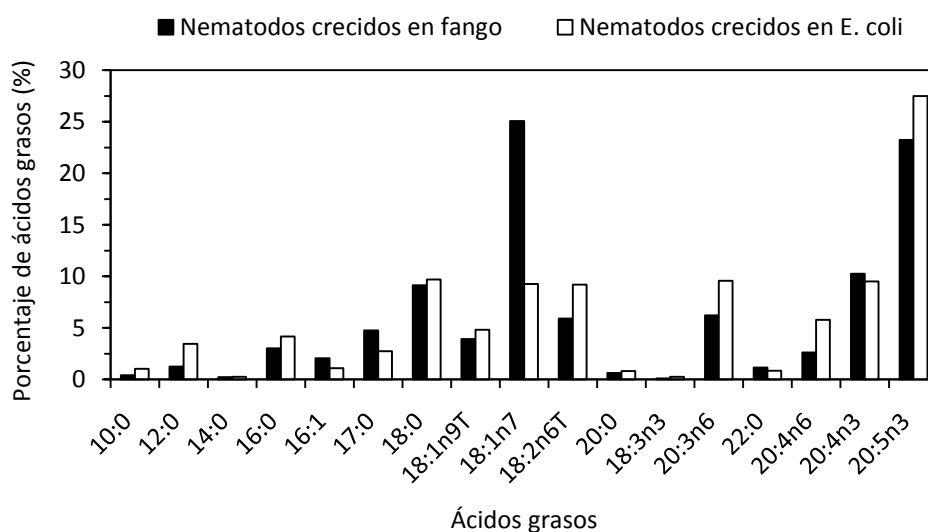


Figura V. 75. Comparativa de los perfiles de ácidos grasos obtenidos a partir de la fracción lipídica de la biomasa de nematodos crecidos a base de fango y biomasa de *E. coli*. Biomasa de nematodo obtenida en placa Petri separada de la biomasa de fango o *E. coli* mediante gradiente de sacarosa.

La tabla V.21 muestra la agrupación de los ácidos grasos en diferentes categorías: saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y la relación entre los ácidos grasos poliinsaturados tipo n3 y n6. Dicha agrupación muestra que la fracción abundante en este tipo de materia grasa son los ácidos grasos poliinsaturados con

48,4% y 61,8% del total habiendo crecido los nematodos en fango y *E. coli*, respectivamente. Esto indica que la obtención de biodiésel no sería de una elevada calidad debido a la abundancia de ácidos grasos inestables (alto grado de insaturación) que tienden a oxidarse.

Tabla V. 21. Agrupaciones de los ácidos grasos obtenidos a partir de la biomasa de *C. elegans* obtenido en cultivos a base de fango y *E. coli*.

Ácidos grasos	% Ácidos grasos a partir de la biomasa de <i>C. elegans</i>	
	Fango	<i>E. coli</i>
Saturados	20,6	23,0
Monoinsaturados	31,1	15,2
Poliinsaturados	48,4	61,8
n3/n6	2,28	1,52
C18:3	0,12	0,26
≥ 4 doble enlaces	36,1	42,8

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados se debe de prestar atención al ácido graso γ -linolénico (C18:3) y los ácidos grasos poliinsaturados (≥ 4 doble enlaces) ya que la normativa europea (EN 14214, 2009) especifica unos límites del 12 y 1%, respectivamente para la obtención de biodiésel de alta calidad. En este caso se cumple el primer límite (0,12% y 0,26%) pero no el segundo para ácidos grasos poliinsaturados (≥ 4 doble enlaces = 36,1% y 42,8%). En este sentido, cabe señalar que para la obtención de biodiésel a partir de biomasa de *C. elegans* es necesario el mezclado de su materia grasa con otros aceites para reducir el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados (Hodaifa et al., 2013). Otra posibilidad, es utilizar cepas de *C. elegans* con porcentajes que cumplan los requisitos para la producción de biodiésel, como por ejemplo la cepa mutante *fat-3 (wa22)* que no produce ácidos grasos poliinsaturados de más de 4 dobles enlaces (Watts y Browse, 2002).

Por otra parte, es interesante señalar la presencia del ácido graso EPA (C20:5n3) en altos porcentajes 23,2 % y 27,5 % obtenidos en la biomasa del nematodo en fango y *E. coli*, respectivamente. Además, Webb y Chu (1982) han indicado que únicamente cuando la relación n3/n6 se encuentra en el rango de 2-5, la biomasa producida tiene alta calidad y aceptación nutricional. El único problema en este caso, es la dificultad a la hora de separar la biomasa del nematodo del fango de depuradora.

V.4. Diseño propuesto del proceso a nivel industrial

V.4.1. Diagrama de flujo del proceso propuesto

A partir de los datos obtenidos en este trabajo de investigación, se ha propuesto un posible diseño del proceso industrial, con el equipamiento necesario para tratar volúmenes de fango generados en una planta depuradora para un millón de habitantes (Figura V.76). Así mismo, a partir de este diseño, se ha llevado a cabo una evaluación económica (apartado V.4.2).

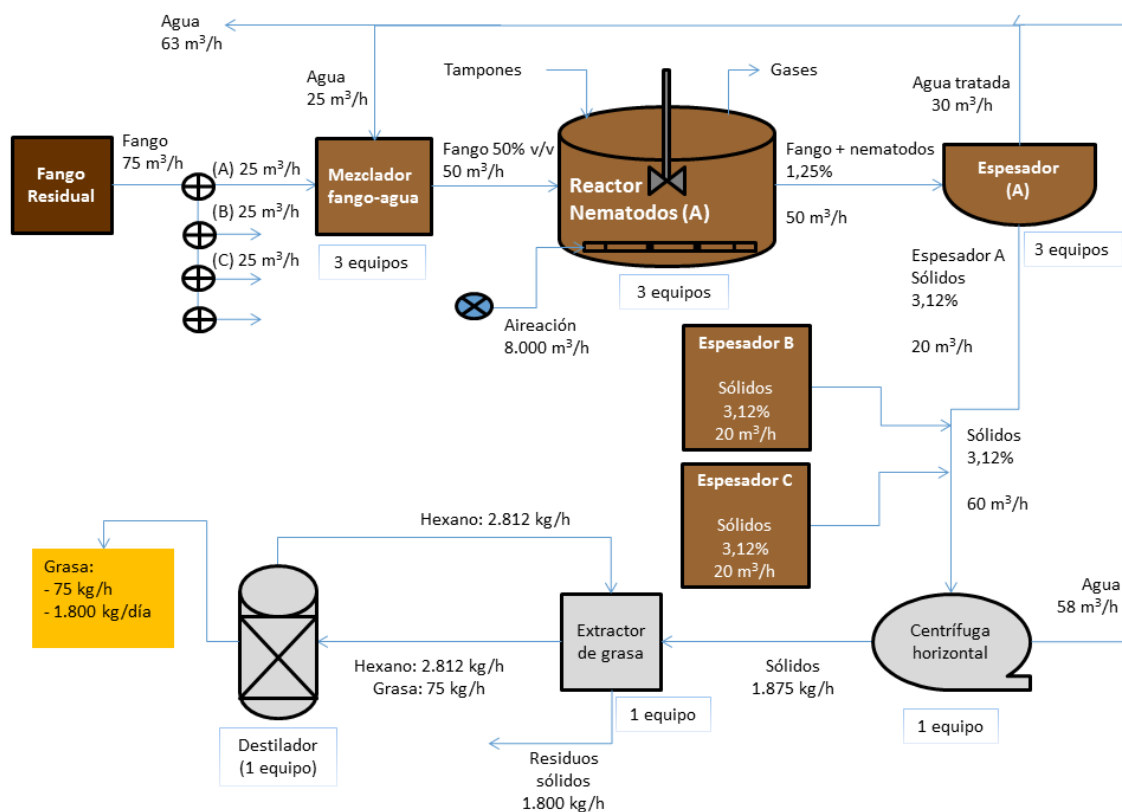


Figura V. 76. Diseño propuesto del proceso de crecimiento de nematodos y producción de materia grasa mediante el cultivo de *C. elegans* en fango del espesador secundario; integrado en una EDAR para 1.000.000 de Habitantes-equivalente. El sistema tiene 3 líneas de trabajo (A, B y C); para simplificar el esquema, sólo se representa la línea A aunque a partir del espesamiento, se integran los caudales de las 3 líneas. Además, se ha fijado una concentración del sustrato del 50% v/v, una conversión de materia orgánica de fango en nematodo del 50% y un porcentaje de materia grasa en el nematodo del 8%.

Hay que mencionar que en la figura V.76 no se abordan los rendimientos de eliminación de la materia orgánica que se consigue mediante el crecimiento de *C. elegans* en fango. Se ha decidido no incluirlo en la ilustración ya que los caudales representan el conjunto de agua y sólidos totales puesto que la humedad es superior al 97%, por lo que se ha decidido incluirlo en una figura independiente (Figura V. 77).

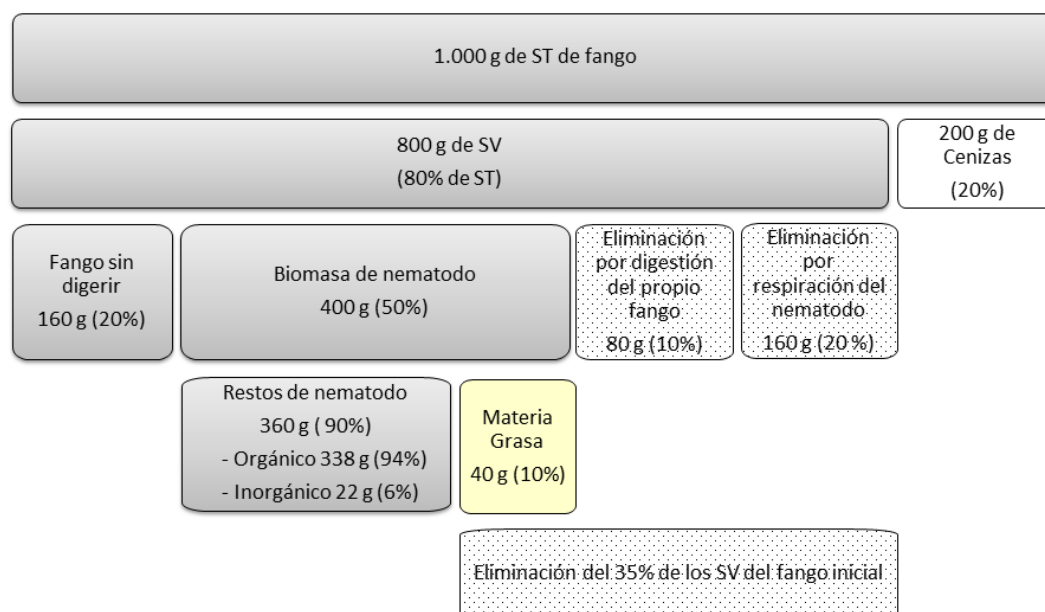


Figura V. 77. Esquema simplificado de las fracciones de reducción de fango a partir del crecimiento de *C. elegans* en fango del espesador secundario para condiciones óptimas de cultivo.

En la figura V.77 se representa de manera detallada el porcentaje de materia orgánica que es reducida mediante el crecimiento de *C. elegans* y cuál es la causa de cada fracción eliminada. Se parte de un supuesto de 1.000 gramos de sólidos totales del fango; de estos sólidos, el 20% es materia inerte (cenizas) y el 80% es materia orgánica susceptible de ser degradada. Durante el cultivo de *C. elegans* bajo las condiciones adecuadas, se elimina en torno a un 30% de materia orgánica aunque se han llegado a obtener valores superiores; hay que matizar que esta reducción se produce por dos factores: respiración del nematodo (20%) y digestión aerobia del propio fango (10%). Por otra parte, se obtiene un 20% de materia orgánica sin digerir y un 50% de biomasa de nematodo a la cual se le puede extraer aproximadamente hasta un 10% de materia grasa.

En definitiva, se ha determinado una reducción de materia orgánica del 35% y, además, el residuo final está más enriquecido en materias inertes que el fango inicial, lo cual es de interés para su evacuación. Los residuos que no han sido degradados,

serían recirculados al digestor anaerobio ya que está descrito que este proceso no se ve afectado negativamente por el crecimiento de otros depredadores (Hendrickx et al., 2010a). De igual manera se espera que ocurra a partir del cultivo de *C. elegans*; no obstante, estudios futuros serán necesarios para confirmar o descartar esta hipótesis.

Se puede comparar el proceso que se describe en este trabajo de investigación con otros sistemas de reducción del fango mediante depredación, como la utilización de oligoquetos. El porcentaje del 35% de eliminación de materia orgánica mediante el cultivo de *C. elegans* es superior al 26% de reducción de SV que describen algunos autores con el cultivo de oligoquetos en continuo (Hendrickx et al., 2010a) y duplica el 16% de eliminación de SV obtenido en discontinuo (Hendrickx et al., 2011). Por otra parte, ciertos autores describen valores de reducción que ascienden al 50% de los SSV (Tamis et al., 2011); lo cual puede sugerir que el porcentaje de reducción obtenido con *C. elegans* es bastante menor y que la depredación con oligoquetos es más recomendable. Sin embargo, hay que tener cuenta que estos autores previamente tamizan el propio fango por lo que la mayor parte del residuo no es degradado y no se tiene en cuenta en esos porcentajes de eliminación. De hecho, utilizan las determinaciones para sólidos solubles volátiles (SSV) en fango mientras que en este trabajo, el porcentaje de reducción se evalúa respecto a la materia orgánica total (SV); de hecho, respecto a los sólidos solubles como los presentes en la fase acuosa analizada en el efluente, se obtienen porcentajes de eliminación de carbono orgánico de hasta del 73% mediante el cultivo con *C. elegans* (Tabla V.14).

Por otra parte, Elissen et al., separa las heces del oligoqueto, y evalúa el tiempo de sedimentación como parte de la mejora en la eliminación de fango obteniendo porcentajes de reducción del 75% de los SST (Elissen et al., 2006); sin embargo, esta separación del oligoqueto y las heces no es escalable a nivel industrial. En adición, este trabajo de investigación puede complementarse con ensayos sobre tiempos de sedimentación ya que es altamente probable que el nematodo sedimente más rápidamente que las bacterias libres de las que se alimenta.

Finalmente, cabe destacar que la escalabilidad del proceso con oligoquetos es más compleja y presenta mayor tiempo de residencia en el reactor ya que la velocidad específica de crecimiento es superior en *C. elegans* ($0,0827\text{ h}^{-1}$) frente a oligoquetos ($0,03\text{ h}^{-1}$) (Song y Chen, 2009). Además, se incrementan los costes debido a la necesidad de fijación de estos depredadores o, al menos, incluir soportes sólidos en el biorreactor (Hendrickx et al., 2009b; Hendrickx et al., 2010a; Hendrickx et al., 2011). Por otra parte, el nematodo *C. elegans*, al ser un organismo modelo tiene una serie de ventajas en cuanto a herramientas genéticas que permitan incrementar su capacidad de alimentarse a partir de fango y, por ejemplo una mayor acumulación de materia grasa si atendemos al objetivo de obtener un valor añadido más allá de la propia reducción del volumen de fango.

V.4.2. Evaluación económica

En función de los datos obtenidos y del posible potencial de implantar el proceso a nivel industrial, se ha realizado una evaluación económica de los costes y beneficios de una posible explotación del proceso. Sin embargo, este estudio es preliminar con el objetivo de estimar la viabilidad del proceso a nivel industrial. Por otra parte, sería muy interesante desarrollar este proceso a nivel de planta piloto o semi-industrial de demostración.

Los caudales de entrada al proceso se han estimado a partir de una planta de depuración de aguas residuales urbanas de hasta 1 millón de habitante-equivalente. En consecuencia, se ha propuesto un sistema de cultivo en continuo con 3 líneas de trabajo, cuyos reactores para el cultivo de *C. elegans* tienen una capacidad de 6.000 m³ cada uno (Tabla V.22).

Los costes del proceso se pueden dividir principalmente en dos: costes de inversión por inmovilizado y costes de operación.

Dentro de los costes de inmovilizado, se pueden incluir los equipos que serían necesarios para el cultivo del nematodo y para la extracción de materia grasa. Una vez conocido su precio, se determinó la inversión necesaria para el desarrollo de la planta (Tabla V.23). Los costes de obra civil, instalación eléctrica y sistemas de control se han estimado mediante extrapolación a partir del coste de los equipos (electromecánico) utilizado en una planta EDAR cuyas características y volúmenes son semejantes a la planta de tratamiento que incluiría el proceso con los nematodos (Tabla V.23).

Por otra parte, los costes de operación se corresponden con la explotación, conservación y mantenimiento derivados del proceso; a su vez, se subdividen en costes fijos y variables. Se han incluido las siguientes partidas: personal, mantenimiento y conservación de las instalaciones, gastos de oficina, seguros, seguridad y salud, electricidad y reactivos químicos. Estos costes se han estimado como el 10% de los costes de inversión total en la planta.

Así mismo, se han determinado los posibles beneficios económicos a obtener derivados del proceso sean en forma de reducción de la materia orgánica del fango o de producción de materia grasa de nematodo.

El porcentaje de eliminación de sólidos totales para condiciones óptimas del crecimiento de la población de nematodos es del 35%, lo cual conlleva un beneficio económico y ambiental; sin embargo, en esta evaluación económica solo se ha estimado el beneficio a partir de la materia grasa obtenida de *C. elegans*. En la tabla V.22 se recoge la producción diaria en materia grasa que podría ser vendida a empresas productoras de biodiésel (0,6 €/kg de materia grasa) o transformada en la propia EDAR.

Tabla V. 22. Datos de diseño del proceso de crecimiento de nematodos en una EDAR para 1.000.000 de habitantes-equivalente. También se muestran los caudales de trabajo y la materia grasa obtenida para valores obtenidos a partir de este trabajo (*) y para los valores que se estima que se pueden alcanzar optimizando el cultivo del nematodo (**).

Datos de una EDAR para 1.000.000 habitantes-equivalente		
Caudal de entrada del agua residual	255.000	m ³ /día
DBO ₅	0,210	kg/m ³
Conversión en el reactor biológico	0,800	kg/kg
Producción de fango del espesador secundario (peso seco)	42.840	kg/día
Caudal de fango del espesador secundario (seco)	1.785	kg/h
Sólidos totales del fango húmedo	2,50	%
Caudal de fango húmedo a tratar	71	m ³ /h
Proceso de crecimiento de <i>C. elegans</i> para 75 m³/h de fango húmedo		
Dilución del fango	50	% v/v
Caudal de entrada del fango diluido	143	m ³ /h
Biorreactores (RCTA)		
Volumen de trabajo	6.000	m ³
Diámetro	40	m
Altura	5	m
Tiempo de residencia	120	h
Caudal de entrada del influente	50	m ³ /h
Caudal de salida del efluente	50	m ³ /h
Número de reactores	3	unidades
Capacidad total de las 3 líneas de crecimiento de <i>C. elegans</i>	150	m ³ /h
Producción de materia grasa		
Producción de fango del espesador secundario (peso seco)	42.840	kg/día
Materia orgánica en el fango	80	%
*Datos actuales de crecimiento y materia grasa		
Materia orgánica convertida en nematodo	51	%
Materia grasa del nematodo (peso seco)	8	%
Materia grasa producida por nematodo	1.398	kg/día
**Datos potenciales de crecimiento y materia grasa		
Materia orgánica convertida en nematodo	65	%
Materia grasa del nematodo (peso seco)	30	%
Materia grasa producida por nematodo	6.683	kg/día

Tabla V.23. Costes de inversión y de operación para la implantación del proceso de crecimiento de nematodo y extracción de materia grasa en una EDAR para 1.000.000 de habitantes-equivalente.

Costes de inversión y de operación del proceso			
Costes de inmovilizado para el crecimiento de <i>C. elegans</i>			
Electro mecánica (EM)			
Equipo	Unidades	Coste	Coste (€)
Sistemas de bombeo	8	2.500	20.000
Agitadores	3	2.700	8.100
Acelerador	12	10.000	120.000
Parrillas	12	15.000	180.000
Soplantes	4	35.000	140.000
		Subtotal	468.100
<hr/>			
Obra Civil (OC)			618.561
Instalación Eléctrica (IE)			133.743
Instalación de sistemas de Control (IC)			41.795
		Subtotal	794.098
<hr/>			
Costes de la extracción de materia grasa			
Espesador por decantación	3	81.000	243.000
Centrífuga horizontal	1	60.000	60.000
Extractor de materia grasa	1	130.000	130.000
Destilador	1	40.000	40.000
		Subtotal	473.000
<hr/>			
		Coste	1.735.198
<hr/>			
Costes de operación (€/año)*		Coste	175.000
<hr/>			
Personal			
Mantenimiento y conservación de instalaciones			
Gastos de oficina			
Seguros			
Seguridad y salud			
Electricidad			
Reactivos químicos			

*Costes de operación estimados como el 10% de los costes de inversión en las EDARs.

En la tabla V.24 se muestra el balance económico del proceso para dos situaciones: datos obtenidos actualmente y datos que se consideran alcanzables en las condiciones óptimas del cultivo del nematodo. En ambos supuestos, el proceso resulta rentable con un beneficio neto anual de 130.000 € y 1.288.577 € y un periodo de amortización de 13,2 y 1,35 años, respectivamente. Por tanto, la estimación económica muestra, a priori, que el proceso puede ser rentable a nivel industrial. Sin embargo, hay que incidir en la necesidad de desarrollar el proyecto a nivel de planta experimental industrial de demostración para su verificación.

Tabla V. 24. Rentabilidad de la implantación del proceso de crecimiento de nematodo en una EDAR para 1.000.000 de habitantes-equivalente. También se muestran dos supuestos: para valores obtenidos en este trabajo de investigación (*) y para valores que potencialmente se pueden conseguir en condiciones óptimas de crecimiento (**). Es decir, un porcentaje de conversión de materia orgánica en nematodo del 51 y el 65%, respectivamente; y un porcentaje de materia grasa del nematodo del 8% para datos actuales y del 30% potencialmente.

Rentabilidad			
	*Datos actuales	**Datos potenciales	
Coste de inversión total	1.735.198	1.735.198	€/EDAR
Coste de operación	175.000	175.000	€/año
Producción de materia grasa	510.270	2.439.295	kg/año
Ingresos	306.162	1.463.577	€/año
Beneficios neto	131.162	1.288.577	€/año
Tiempo de amortización	13,2	1,35	años

En definitiva, nos encontramos ante un bioproceso de biotecnología industrial cuyos principales objetivos son la sostenibilidad ambiental y económica de las EDARs. A lo largo de este trabajo de investigación se ha podido observar que es un proyecto viable; en el cual se puede crecer el nematodo *C. elegans* a partir de fango reduciendo los volúmenes de materia orgánica y produciendo materia grasa como producto de valor añadido. Además, se ha evaluado su rentabilidad económica con resultados satisfactorios. Por tanto, es deseo del autor que este trabajo represente el punto de inicio en la descripción de un proceso novedoso. Por supuesto, sin subestimar la complejidad del mismo, quedando un enorme camino experimental por recorrer para conseguir optimizar y escalar el proceso para su implantación a nivel industrial; integrándose en el tratamiento de las aguas residuales y los fangos derivados del mismo.

V.5. Mejoras y posibles estudios futuros

V.5.1. Utilización directa del fango de recirculación biológica

El fango del espesador secundario ha sido seleccionado como el más adecuado para el cultivo del nematodo. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el fango de recirculación biológica pueda tener un mayor potencial de crecimiento del nematodo a los resultados obtenidos en los experimentos iniciales.

En principio, el fango de recirculación biológica tiene como problemática una baja concentración en materia orgánica siendo menor al 0,2% frente al 2,6% en fango del espesador secundario. Pero considerando el concepto “accesibilidad”, el fango puede perder potencialidad como alimento para el nematodo una vez agitado y espesado. Por ello, se han realizado diversos ensayos haciendo uso directo del fango de recirculación biológica y concentrándolo por una decantación natural (Figura V.78).

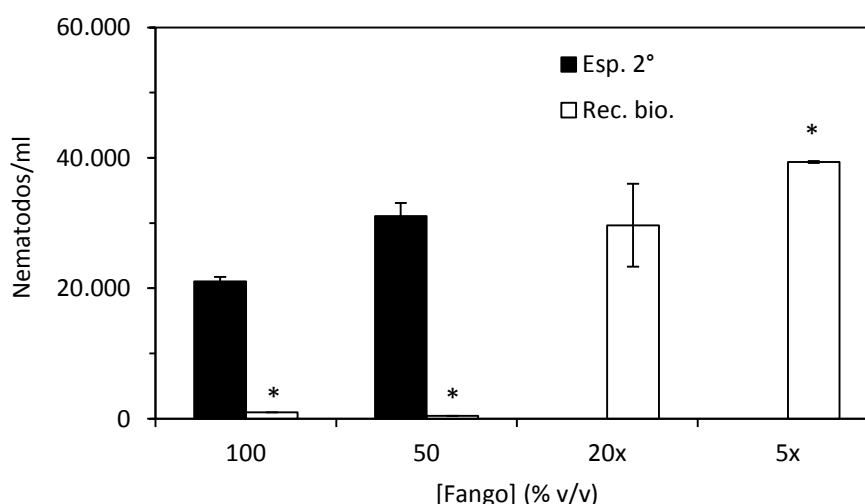


Figura V. 78. Crecimiento máximo poblacional de *C. elegans* alimentado con fango del espesador secundario y fango de recirculación biológica para concentraciones del 100% y del 50% (v/v). También se muestra el crecimiento en fango de recirculación biológica concentrado mediante decantación (20x y 5x, v/v). Las barras de error representan la desviación estándar. El cultivo se ha realizado en matraces de orbital rotatorio. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al fango del espesador secundario al 100% (v/v).

Como se puede observar en la figura V.78, el fango de recirculación biológica concentrado 5x y 20x (v/v) permite un crecimiento poblacional del nematodo que iguala e incluso supera al obtenido para el fango del espesador secundario al 100% (v/v). Por tanto, es posible que ensayando con diferentes decantaciones de fango de la corriente de recirculación biológica, se puedan obtener poblaciones de nematodo superiores y tal vez cultivos más estables.

V.5.2. Efecto de pretratamientos del fango en la población de nematodos

Uno de los grandes retos de este proyecto es la obtención de un método de cultivo en reactores que sea robusto y permita un elevado crecimiento poblacional con independencia de factores externos. Sin embargo, uno de los parámetros más heterogéneos es el propio fango ya que, como bien se sabe, varía a lo largo de la semana, mes y año. Por tanto, una posible solución puede ser la realización de pretratamientos que garanticen una homogeneidad constante del mismo y que permita el incremento de la población de nematodos, al máximo.

En este sentido, se han llevado a cabo diferentes pretratamientos: choque térmico (i), sonicación (ii) y microondas (iii).

Como resultado, se ha obtenido que el choque térmico no constituye un pretratamiento efectivo, al menos en las condiciones ensayadas; obteniéndose poblaciones similares que en el caso del fango sin tratar o incluso menores (Sin tratar = 49.400 nematodos/ml, T^a (40°C) = 46.966 nematodos/ml, T^a (80°C) = 28.933 nematodos/ml y T^a (100°C) = 26.667 nematodos/ml).

En el caso de la sonicación del fango como pretratamiento, se ha observado aumento en la población de *C. elegans*, registrando un incremento medio del 25%; registrándose 53.233 nematodos/ml para cultivos sin tratar y 68.000 nematodo/ml utilizando fango sonificado previamente (durante 60-120 s).

La figura V.79 muestra el efecto de la aplicación de microondas en el crecimiento poblacional de los nematodos. Donde se ha registrado un incremento de 1,5 veces mayor respecto al control, lo cual indica que la aplicación de microondas puede ser interesante para la homogeneidad del fango y asegurar la producción constante de la población de nematodos.

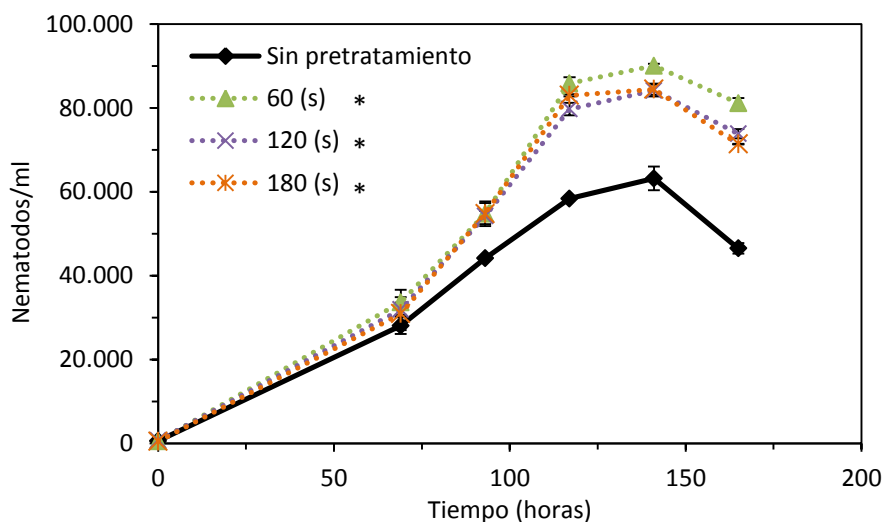


Figura V. 79. Curva de crecimiento de *C. elegans* a partir del fango del espesador secundario sometido a un pretratamiento con microondas para varios tiempos de aplicación. El cultivo se ha realizado en matraces de orbital rotatorio. Las barras de error representan la desviación estándar. Se ha aplicado la prueba estadística t-Student considerándose diferencias significativas con un p-valor < 0,05 (*) respecto al control sin pretratamiento.

En cuanto a la aplicación de microondas a escala industrial en las EDARs, existen estudios al respecto de su aplicación como pretratamiento físico que genera efectos positivos sobre la degradación del fango y la producción de biogás, con lo cual es un pretratamiento tecnológicamente factible (Zhen et al., 2014; Saha et al., 2011). A pesar de ello, es necesaria una evaluación económica para determinar si es rentable dicho incremento del rendimiento del proceso frente a la elevación de los costes de operación derivados del pretratamiento.

No obstante, en un futuro será necesario realizar estos ensayos con fangos de diferentes fechas que permitan determinar si este pretratamiento proporciona homogeneidad del proceso con respecto a las variables ecológicas que pueda aportar el fango; y determinar cómo afecta a los parámetros de degradación del fango.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones de este trabajo de investigación:

- VI.1.** Es viable el cultivo del nematodo *C. elegans* alimentado a partir de fangos procedentes de las EDARs.
- VI.2.** El fango del espesador secundario permite un mayor crecimiento poblacional del nematodo que los fangos del espesador primario, cámara de mezcla, recirculación biológica y digerido.
- VI.3.** El crecimiento de la población de nematodos es heterogéneo para fangos de distintas fechas sin relación aparente con un factor estacional o de composición físico-química del fango.
- VI.4.** La relación entre el número, el peso seco y el carbono orgánico total del nematodo permite calcular de manera indirecta la conversión de materia orgánica del fango en biomasa de nematodo.
- VI.5.** Un inóculo inicial de 500 nematodos/ml es, aparentemente, el óptimo para obtener un crecimiento máximo de la población de *C. elegans*.
- VI.6.** El cultivo de *C. elegans* en biorreactores de 1L de volumen de trabajo permite obtener poblaciones óptimas de hasta 80.000 nematodos/ml a partir de fango del espesador secundario.
- VI.7.** El crecimiento de *C. elegans* alimentado con fango del espesador secundario en biorreactores ha permitido determinar la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m), la productividad en biomasa (P) y la velocidad específica máxima de muerte (μ_d).
- VI.8.** Concentraciones de fango iniciales en el rango 25-60% v/v permiten un crecimiento óptimo de *C. elegans* mostrando valores máximos de velocidad específica máxima de crecimiento ($0,0827 \text{ h}^{-1}$) y productividad en biomasa ($1.924 \text{ nem ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$), además de una menor velocidad específica de muerte ($-0,0235 \text{ h}^{-1}$).
- VI.9.** Un caudal de aire entre 0,5 y 2 L/min permite un crecimiento óptimo de *C. elegans* presentando valores máximos de velocidad específica máxima de crecimiento ($0,0546 \text{ h}^{-1}$) y menores para la velocidad específica máxima de muerte ($0,0177 \text{ h}^{-1}$), aunque la productividad máxima en biomasa se obtiene para 3L/min ($1.310 \text{ nem ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

- VI.10.** La velocidad de agitación mecánica en el rango de 80-220 rpm permite un crecimiento óptimo de *C. elegans* mostrando valores elevados de velocidad específica máxima de crecimiento ($0,0372 \text{ h}^{-1}$) y productividad ($457 \text{ nem ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Para valores de agitación mecánica superiores a 220 rpm, se incrementa ligeramente la velocidad específica máxima de crecimiento pero disminuye la productividad.
- VI.11.** La velocidad específica máxima de crecimiento de *C. elegans* en fango es máxima para una concentración de fango inicial del 25% v/v, un caudal de aireación de 2 L/min y una velocidad de agitación mecánica de 300 rpm.
- VI.12.** La reducción de la materia orgánica del fango oscila en función de las condiciones de cultivo de *C. elegans* alcanzándose un porcentaje máximo del 40% de eliminación del carbono orgánico total en el efluente global.
- VI.13.** Las constantes de degradación del fango calculadas en base al contenido en COT, han sido superiores para el cultivo mixto de fango más el nematodo *C. elegans* frente al cultivo de control (fango sin nematodos), registrando el máximo valor para la constante de reacción a la concentración inicial de fango del 35% v/v ($K_{\text{COT, EG}} \times 10^{-7} = 15,3 \text{ (L mg}^{-1}\text{h}^{-1})$).
- VI.14.** El máximo porcentaje de eliminación del COT en el efluente global ha sido el 38,5% para una concentración inicial de fango del 50% v/v.
- VI.15.** La eliminación del contenido en nitrógeno del efluente global, solo se registra en concentraciones de fango iniciales superiores al 35 % (v/v); coincidiendo con una mayor concentración detectada de nitratos y nitritos.
- VI.16.** En la fase acuosa se ha registrado una caída de los valores de CT y COT en todos los experimentos, lo que indica que el sistema fango-nematodo mejora la calidad del agua final obtenida; alcanzándose una reducción máxima del COT del 64%.
- VI.17.** La eliminación de la materia orgánica de la fase líquida en función de la biomasa global generada o reducida ha alcanzado su máximo en el experimento con la concentración del 35% (v/v) de fango inicial.
- VI.18.** Las velocidades de suministro de aire de 0,5 y 1 L/min son las óptimas para alcanzar valores máximos de las constantes de degradación $17,7 \times 10^{-7} \text{ (L mg}^{-1}\text{h}^{-1})$ y el porcentaje de eliminación (40,2%) en base al contenido en COT en el efluente global.
- VI.19.** La eliminación de nitrógeno se produce a caudales de suministro de aire inferiores a 1 L/min. A caudales superiores, la generación de biomasa de fango es superior a la capacidad de eliminación de la biomasa microbiana por parte del nematodo.

- VI.20.** En la fase líquida, para un caudal de aire de 0,5 L/min se observa una máxima eliminación del COT, coincidiendo con un valor máximo de la constante de degradación de materia orgánica en base al COT ($52,7 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) manteniéndose sin variaciones apreciables en torno a un valor medio de $23,9 \pm 3,78$ ($\text{L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al incrementar la velocidad de suministro de aire.
- VI.21.** La concentración de nitrógeno total en la fase líquida se incrementa para todos los caudales de aireación, con excepción del experimento sin aireación donde se elimina netamente un 6,96% del nitrógeno de la fase clara.
- VI.22.** Los rendimientos del carbono orgánico de la fase acuosa respecto a la biomasa, muestran que operar con caudales de suministro de aire en el rango 0-1,5 L/min permite conseguir una fase clara (agua tratada) de mejor calidad.
- VI.23.** Para todas las velocidades de suministro de aire, se ha observado degradación de la biomasa total (fango + nematodos), donde la máxima degradación en base a carbono orgánico se ha determinado a un caudal de aire de 0,5 L/min ($K_{\text{COT},B} = 2,09 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$).
- VI.24.** La constante de degradación del nitrógeno total de la biomasa disminuye linealmente con el incremento de la velocidad de suministro de aire.
- VI.25.** El incremento de la velocidad de agitación mecánica produce una disminución en la capacidad de reducción de materia orgánica del efluente global; observándose un valor máximo de la constante de degradación del COT ($20,4 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para el cultivo sin agitación y el máximo porcentaje de eliminación del COT al operar a una baja velocidad de agitación de 40 rpm (32%).
- VI.26.** La eliminación del nitrógeno total del efluente global es prácticamente nula para velocidades de agitación superiores a 40 rpm.
- VI.27.** En la fase líquida, la velocidad de agitación mecánica y las constantes de degradación de la materia orgánica muestran una tendencia creciente muy suave, pudiéndose considerar un valor medio para las constantes ($K_{\text{COT},S} = 21,2 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$).
- VI.28.** La eliminación del carbono orgánico en la fase líquida se incrementa notablemente con el aumento de la agitación mecánica de 0 a 40 rpm, manteniendo una ligera tendencia creciente en el rango de 40-400 rpm con porcentajes de eliminación del COT del 52 y 58,5%, respectivamente.
- VI.29.** En la fase líquida se produce incremento de nitrógeno para todas las velocidades de agitación ensayadas, obteniéndose los valores mínimos de la constante de

generación del nitrógeno y el porcentaje de generación de nitrógeno para 220 rpm ($K_{NT,S} = -6,44 \times 10^{-6} \text{ L mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y -14,2%, respectivamente).

- VI.30.** El rendimiento del carbono orgánico total del agua tratada respecto al COT de la biomasa presenta su valor máximo (2,09 g de COT_S/g de COT_B) en ausencia de agitación mecánica, disminuye linealmente entre el rango de 0-100 rpm y se mantiene casi constante entre 100 y 400 rpm.
- VI.31.** Las constantes de degradación tanto para carbono orgánico y como para el nitrógeno muestran una ligera tendencia decreciente respecto al incremento de la velocidad de agitación.
- VI.32.** El 10% de la reducción de la materia orgánica en el efluente global es producida por la digestión aerobia de los propios microorganismos presentes en el fango.
- VI.33.** La materia grasa del efluente global al final de los experimentos realizados en biorreactores oscila entre el 0,3 y el 6,6% del peso seco.
- VI.34.** La materia grasa de *C. elegans* oscila entre el 5 y el 11% del peso seco del nematodo dependiendo del medio de cultivo, los estadios poblacionales predominantes y la estirpe utilizada.
- VI.35.** El perfil de ácidos grasos de *C. elegans* cultivado en fango es equivalente al obtenido en los cultivos en el medio estándar de laboratorio cuya fuente de carbono es *E. coli*; con la excepción de un incremento en la concentración de ácido vaccínico.
- VI.36.** El crecimiento de la población de nematodos es significativamente mayor al suplementar el medio de cultivo de fango con siete componentes (NaCl , KH_2PO_4 , colesterol, citrato potásico, trazas de metales, MgSO_4 y CaCl_2).
- VI.37.** Los componentes que se adicionan para el cultivo de *C. elegans* pueden reducirse de siete a dos (NaCl y KH_2PO_4) sin afectar negativamente al crecimiento del nematodo.
- VI.38.** El fango de recirculación biológica concentrado mediante decantación permite crecimientos de la población de nematodos próximos a los observados para el fango del espesador secundario.
- VI.39.** El pretratamiento del fango con microondas, previamente al cultivo con el nematodo, permite incrementar el crecimiento de la población de manera significativa en un 20%.
- VI.40.** El estudio económico preliminar sugiere que la implantación del proceso a nivel industrial es potencialmente rentable.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbassi B., Dullstein S. y Rübiger N. 2000. «Minimization of excess sludge production by increase of oxygen concentration in activated sludge flocs; experimental and theoretical approach.» *Water Research* 34 (1): 139-46.
- Adlimoghaddam A., Boeckstaens M., Marini A.M., Treberg J. R., Brassinga A.-K. C. y Weihrauch D. 2015. «Ammonia excretion in *Caenorhabditis elegans*: mechanism and evidence of ammonia transport of the Rhesus protein CeRhr-1.» *Journal of Experimental Biology* 218 (5): 675-83.
- Albert P., y Riddle D. 1988. «Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae.» *Developmental biology* 126 (2): 270-93.
- Amanatidou E., Samiotis G., Bellos D., Pekridis G. y Trikoilidou E. 2015. «Net biomass production under complete solids retention in high organic load activated sludge process.» *Bioresource Technology* 182: 193-99.
- Arden E. y Lockett W.T. 1914. «Experiment on the Oxidation of Sewage Without the Aid of Filters.» *Journal Society of the Chemical Industry* 33 (10): 523-539.
- Ashrafi K. 2006. «Mapping out starvation responses.» *Cell Metabolism* 3 (4): 235-236.
- Ashrafi K., Chang F. Y., Watts J.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J. y Ruvkun G. 2003. «Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes.» *Nature* 421 (6920): 268-72.
- Bain M.B. y Stevenson N.J. 1999. «Common Methods for Aquatic Habitat Assessment.» *American Fisheries Society*.
- Barsyte D., Lovejoy D.A. y Lithgow G.J. 2001. «Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*.» *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (3): 627-34.
- Bazylinski D.A. y Blakemore R.P. 1983. «Denitrification and Assimilatory Nitrate Reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*.» *Applied and environmental microbiology* 46 (5): 1118-24.
- Befesa Gestión de Residuos S.L. 2012. «Análisis de metales pesados de Aguas Residuales en la EDAR de Copero (Sevilla).» *Datos no publicados*.
- Behr A., Westfechtel A. y Pérez Gomes J. 2008. «Catalytic processes for the technical use of natural fats and oils.» *Chemical Engineering and Technology* 31 (5): 700-714.
- Bertani G. 1951. «Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.» *Journal of bacteriology* 62 (3): 293-300.

- Bligh E.G. y Dyer W.J. 1959. «A rapid method of total lipid extraction and purification.» *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8): 911-17.
- Boon A.G., Burgess D.R. 1974. «Treatment of crude sewage in two high-rate activated sludge plants operated in series.» *Journal of the Water Pollution Control* 74: 382.
- Brenner S. 1974. «The genetics of *Caenorhabditis elegans*.» *Genetics* 77 (1): 71-94.
- Brock T.J., Browse J. y Watts J.L. 2006. «Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*.» *PLoS Genetics* 2 (7): 0997-1005.
- Broeks A., Gerrard B., Allikmets R., Dean M. y Plasterk R.H. 1996. «Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*.» *The EMBO journal* 15 (22): 6132-43.
- Buys B.R., Klapwijk A., Elissen H. y Rulkens W.H. 2008. «Development of a test method to assess the sludge reduction potential of aquatic organisms in activated sludge.» *Bioresource Technology* 99 (17): 8360-66.
- Byerly L., Cassada R.C., y Russell R.L. 1976. «The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*.» *Developmental Biology* 51 (1): 23-33.
- Cassada R.C. y Russell R.L. 1975. «Dauerlarva, A Post-Embryonic Developmental Variant Of Nematode *Caenorhabditis-Elegans*.» *Developmental Biology* 46 (2): 326-42.
- CEE. 1991. «Council directive of 21 May 1991 concerning urban wastewater treatment (91/271/EEC).» *Off J Eur Commun* 135: 40-52.
- Chen G.H., Saby S., Djafer M. y Mo H.K. 2001a. «New approaches to minimize excess sludge in activated sludge systems.» *Water Science and Technology* 44: 203-8.
- Chen G.H., Yip W.K, Mo H.K. y Liu Y. 2001b. «Effect of sludge fasting/feasting on growth of activated sludge cultures.» *Water Research* 35 (4): 1029-37.
- Chen G.H., An K.J., Saby S., Brois E. y Djafer M. 2003. «Possible cause of excess sludge reduction in an oxic-settling-anaerobic activated sludge process (OSA process).» *Water Research* 37 (16): 3855-66.
- Chu C.P., Chang B.V., Liao G.S., Jean D.S. y Lee D.J. 2001. «Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge.» *Water Research* 35 (4): 1038-46.

- Chu L., Yan S., Xing X.H., Sun X. y Jurcik B. 2009. «Progress and perspectives of sludge ozonation as a powerful pretreatment method for minimization of excess sludge production.» *Water Research* 43 (7): 1811-22.
- Chudoba P., Chevalier J.J., Chang J. y Capdeville B. 1991. «Effect of anaerobic stabilization of activated sludge on its production under batch conditions at various S_0/X_0 ratios.» *Water Science and Technology* 23 (4-6): 917-26.
- Commission Directive (EU). 2015. «COMMISSION DIRECTIVE (EU) 2015/1127 of 10 July 2015 amending.»
- Cooper A.F. y Van Gundy S.D. 1970. «Metabolism of Glycogen and Neutral Lipids by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis* sp. in Aerobic, Microaerobic and Anaerobic Environments.» *Journal of Nematology* 2 (4): 305-15.
- Crossette B. 2011. «Fondo de Población de las Naciones Unidas.» *Fondo de Población de las Naciones Unidas UNFA*, 132.
- Curds C. R., y Cockburn A. 1970. «Protozoa in biological sewage-treatment processes-I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants.» *Water Research* 4 (3).
- C. *elegans* Sequencing Consortium. 1998. «Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. » *Science* 282: 2012-2018.
- Davis D.E., Hyun C.R., Deshmukh K., Bruinsma J.J., Schneider D.L., Guthrie J., Robertson J.D. y Kornfeld K. 2009. «The cation diffusion facilitator gene *cdf-2* mediates zinc metabolism in *Caenorhabditis elegans*.» *Genetics* 182 (4): 1015-33.
- De La Torre M. 2003. «Challenges for mass production of nematodes in submerged culture.» *Biotechnology Advances* 21 (5): 407-16.
- Deleris S., Geaugey V., Camacho P., Debellefontaine H., y Paul E. 2002. «Minimization of sludge production in biological processes: An alternative solution for the problem of sludge disposal.» *Water Science and Technology* 46 (10): 63-70.
- European Standard EN 14214:2008+A1. 2009. «Automotive fuels-fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-requirements and test methods.»
- Elissen H.J.H., Hendrickx T.L.G., Temmink H. y Buisman C.J.N. 2006. «A new reactor concept for sludge reduction using aquatic worms.» *Water Research* 40 (20): 3713-18.
- Elissen H.J.H., Mulder W.J., Hendrickx T.L.G., Elbersen H.W., Beelen B., Temmink H. y Buisman C.J.N. 2010. «Aquatic worms grown on biosolids: Biomass composition and potential applications.» *Bioresource Technology* 101 (2): 804-11.

- Elissen H.J.H., Peeters E., Buys B.R., Klapwijk A. y Rulkens W. 2008. «Population dynamics of free-swimming Annelida in four Dutch wastewater treatment plants in relation to process characteristics.» *Hydrobiologia* 605 (1): 131-42.
- Fouad A.D., Pu S.H., Teng S., Mark J.R., Fu M., Zhang K., Huang J., Raizen D.M. y Fang-yen C. 2017. «Quantitative Assessment of Fat Levels in *Caenorhabditis elegans* Using Dark Field Microscopy» 7 (June): 1811-18.
- Fytli D. y Zabaniotou A. 2008. «Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods-A review.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12 (1): 116-40.
- Ghedini E., Wang S., Spiro D., Caler E., Zhao Q., Allen J.E., Delcher A.L., et al. 2007. «Draft Genome of the Filarial Nematode Parasite *Brugia malayi*.» *Science* 317 (5845): 1756-60.
- Guerrero D. y Muñoz MJ. 2011. «Peso seco de *C. elegans* alimentado a partir de *E. coli*.» *Datos no publicados*.
- Hajjari M., Tabatabaei M., Aghbashlo M. y Ghanavati H. 2017. «A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 72: 445-64.
- Hendrickx T.L.G., Temmink H., Elissen H.J.H y Buisman C.J.N. 2009a. «The effect of operating conditions on aquatic worms eating waste sludge.» *Water research* 43 (4): 943-50.
- Hendrickx T.L.G., Temmink H., Elissen H.J.H y Buisman C.J.N. 2009b. «Aquatic worms eating waste sludge in a continuous system.» *Bioresource Technology* 100 (20): 4642-48.
- Hendrickx T.L.G., Temmink H., Elissen H.J.H y Buisman C.J.N. 2010a. «Aquatic worms eat sludge: mass balances and processing of worm faeces.» *Journal of hazardous materials* 177 (1-3): 633-38.
- Hendrickx T.L.G., Temmink H., Elissen H.J.H y Buisman C.J.N. 2010b. «Design parameters for sludge reduction in an aquatic worm reactor.» *Water Research* 44 (3): 1017-23.
- Hendrickx T.L.G., Elissen H.H.J., Temmink H. y Buisman C.J.N. 2011. «Operation of an aquatic worm reactor suitable for sludge reduction at large scale.» *Water Research* 45 (16): 4923-29.

- Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M., Marais G. y Vanloosdrecht M. 1999. «Activated Sludge Model No.2d, ASM2d.» *Water Science and Technology* 39 (1): 165-82.
- Henze M., Gujer W., Mino M. y Van Loosdrecht, M.C.M. 2000. «Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3.» *IWA Scientific and Technical Report* nº 9.
- Hodaifa, G., Sánchez S., Martínez M.E. y Órpez R. 2013. «Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium.» *Applied Energy* 104: 345-52.
- Hodgkin J. y Herman R.K. 1998. «Changing styles in *C. elegans* genetics.» *Trends in Genetics* 14 (9): 352-57.
- Hope I.A. 1999. «*C. elegans*. A practical approach.» *Oxford University Press*.
- Hu P.J. 2007. «Dauer.» *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community* (8 de agosto): 1-19.
- Huang X., Liang P. y Qian Y. 2007. «Excess sludge reduction induced by *Tubifex tubifex* in a recycled sludge reactor.» *Journal of biotechnology* 127 (3): 443-51.
- Ichinari T., Ohtsubo A., Ozawa T., Hasegawa K., Teduka K., Oguchi T. y Kiso Y. 2008. «Wastewater treatment performance and sludge reduction properties of a household wastewater treatment system combined with an aerobic sludge digestion unit.» *Process Biochemistry* 43 (7): 722-28.
- Sulston J. y Hodgkin J. 1988. «Methods, The nematode *C. elegans*.» Editado por Wood W.B. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY.
- Katarzyna C. y Marquez-Rocha F-J.. 2004. «Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae.» *Biotechnology (Faisalabad)* 3 (1): 21-34.
- Khursheed A., y Kazmi A. 2011. «Retrospective of ecological approaches to excess sludge reduction.» *Water Research* 45 (15): 4287-4310.
- Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y. y Ruvkun G. 1997. «*daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*.» *Science* 277 (5328): 942-46.
- Kniazeva M., Sieber M., McCauley S., Zhang K., Watts J.L. y Han M. 2003. «Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*.» *Genetics* 163 (1): 159-69.

- Knothe G. y Razon L.F. 2017. «Biodiesel fuels.» *Progress in Energy and Combustion Science* 58: 36-59.
- Kurzchalia T. y Ward S. 2003. «Why do worms need cholesterol?» *Nature cell biology* 5 (8): 684-88.
- Lapinski J., y Tunnacliffe A. 2003. «Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers.» *Water Research* 37 (9): 2027-34.
- Laranjeiro R., Harinath G., Burke D., Braeckman B. y Driscoll M. 2017. «Single swim sessions in *C. elegans* induce key features of mammalian exercise.» *BMC Biology* 15 (1): 30.
- Lee D.L., y Atkinson H.J. 1976. «Physiology of Nematodes.» *London: MacMillan*. 536.
- Lee E., Jalalizadeh M. y Zhang Q. 2015. «Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review.» *Algal Research* 12: 497-512.
- Lee N.M. y Welander T. 1996. «Reducing sludge production in aerobic wastewater treatment through manipulation of the ecosystem.» *Water Research* 30 (8): 1781-90.
- Lewis J. A. y Fleming J.T. 1995. «Chapter 1 Basic Culture Methods.» *Methods in Cell Biology* 48: 3-29.
- Liang P., Huang X. y Qian Y. 2006a. «Excess sludge reduction in activated sludge process through predation of *Aeolosoma hemprichi*.» *Biochemical Engineering Journal* 28 (2): 117-22.
- Liang P., Huang X., Qian Y., Wei Y. y Ding G. 2006b. «Determination and comparison of sludge reduction rates caused by microfaunas' predation.» *Bioresource Technology* 97 (6): 854-61.
- Lin Y.T., Hoang H., Hsieh S.I., Rangel N., Foster A.L., Sampayo J.N., Lithgow G.J. y Srinivasan C. 2006. «Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant.» *Free Radical Biology and Medicine* 40 (7): 1185-93.
- Liu Y. 2000. «The So/Xo-dependent dissolved organic carbon distribution in substrate-sufficient batch culture of activated sludge.» *Water Research* 34 (5): 1645-51.
- Low E.W. y Chase H.A. 1999a. «Reducing production of excess biomass during wastewater treatment.» *Water Research* 33 (5): 1119-32.

- Low E.W. y Chase H.A. 1999b. «The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment.» *Water Research* 33 (3): 847-53.
- Metcalf y Eddy. 2000. «Ingeniería de Aguas Residuales.» 3ª Edición. *McGrawHill*, NY.
- Ministerio de Medio Ambiente. 2006. «Plan nacional integrado de residuos PNIR 2007-15». *BOE* de 26 de febrero de 2009 nº 49: 19893-20016.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2009. «Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España.» *Catálogo general de publicaciones oficiales* NIPO: 770-09-206-6.
- Ministerio de Medio Ambiente. 2001. «Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales-EDAR (PNLD)-(2001-2006).» *BOE* de 12 de julio de 2001 nº 166: 25297-25304.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2016. «Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022». *BOE* de 12 de diciembre de 2015 nº 297: 117395-117397.
- Monod J. 1949. «The growth of bacterial cultures.» *Annual Reviews Microbiology* 3 (1): 371-394.
- More T.T., Yan S., Tyagi R.D. y Surampalli R.Y. 2010. «Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment.» *Bioresource Technology* 101 (20): 7691-7700.
- Moussa M.S., Hooijmans C.M., Lubberding H.J., Gijzen H.J. y Van Loosdrecht M.C.M. 2005. «Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge.» *Water Research* 39 (20): 5080-98.
- Murphy J.T., Bruinsma J.J., Schneider D.L., Collier S., Guthrie J., Chinwalla A., Robertson J.D., Mardis E.R. y Kornfeld K. 2011. «Histidine protects against zinc and nickel toxicity in *Caenorhabditis elegans*.» *PLoS Genetics* 7 (3).
- Nandakumar M. y Tan M.W. 2008. «Gamma-linolenic and stearidonic acids are required for basal immunity in *Caenorhabditis elegans* through their effects on p38 MAP kinase activity.» *PLoS Genetics* 4 (11).
- Nigon V.M. y Félix M.-A. 2017. «History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms.» *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-91.

- O'Riordan V.B. y Burnell A.M. 1989. «Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*- 1. Glycolysis, gluconeogenesis, oxidative phosphorylation and the tricarboxylic acid cycle.» *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B* 92 (2): 233-38.
- O'Riordan V.B. y Burnell A.M. 1990. «Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*-II. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation.» *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B* 95 (1): 125-30.
- Pandey A. y Singh R.K. 2014. «Industrial Waste Water Treatment by Membrane Bioreactor System», *Elixir Chemical Engineering*. 70: 23772-23777.
- Parlamento y Consejo Europeo. 2008. «Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain directives (Waste framework).» *Official Journal of the European Union* de 22 de Noviembre: 3-30.
- Rensink J. y Rulkens W. 1997. «Using metazoa to reduce sludge production.» *Water Science and Technology* 36 (11): 171-79.
- Rensink J., Vanderven J., Vanpamelen G., Fedder F. y Majoor E. 1997. «The Modified Renphosystem: A high biological nutrient removal system.» *Water Science and Technology* 35 (10): 137-46.
- Riddle D.L., Blumenthal T., Meyer B.J. y Priess J.R. 1997. «*C. Elegans* II.» *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY, 3.
- Rodriguez-Perez S. y Fermoso F.G. 2016. «Influence of an oxic settling anoxic system on biomass yield, protozoa and filamentous bacteria.» *Bioresource Technology* 200: 170-77.
- Follett R.F. 2001. «Nitrogen Transformation and Transport Processes.» En: *Nitrogen in the Environment: Sources, Problems and Management*, Follett R.F. y Hatfield J.L. (Eds.), Elsevier B.V., USA, NY, 2º Capítulo: 19-51.
- Rothstein, M. 1965. «Nematode biochemistry - V. Intermediary metabolism and amino acid interconversions in *C. briggsae*.» *Comparative Biochemistry and Physiology* 14: 541-52.
- Rothstein M. y Mayoh H. 1965. «Nematode biochemistry. VII. Presence of isocitrate lyase in *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix acetii*, and *Rhabditis anomala*.» *Comparative biochemistry and physiology* 16: 361-65.
- Rothstein M. 1963. «NEMATODE BIOCHEMISTRY--III. EXCRETION PRODUCTS.» *Comparative Biochemistry Physiology* 9: 51-59.

- Saavedra J., Hodaifa G., y Muñoz MJ. 2013. «Producción de biomasa de *Caenorhabditis elegans* a partir de residuos de levadura de la industria cervecera». *Proyecto Fin de Máster*. Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).
- Saby S., Djafer M. y Chen G.H. 2002. «Feasibility of using a chlorination step to reduce excess sludge in activated sludge process.» *Water Research* 36 (3): 656-66.
- Saby S., Djafer M. y Chen G.H. 2003. «Effect of low ORP in anoxic sludge zone on excess sludge production in oxic-settling-anoxic activated sludge process.» *Water Research* 37 (1): 11-20.
- Saha M., Eskicioglu C. y Marin J. 2011. «Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge.» *Bioresource Technology* 102 (17): 7815-26.
- Satouchi K., Hirano K., Sakaguchi M., Takehara H. y Matsuura F. 1993. «Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*.» *Lipids* 28 (9): 837-40.
- Schuchardt U., Sercheli R.V. y Vargas R.M. 1998. «Transesterification of vegetable oils: A review». *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9 (3): 199-210.
- Seadi T.A., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S. y Janssen R. 2008. «*Biogas Handbook*.» Igarss.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México. 2013. «Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero (INEGEI) 1990-2010.» *Ine* (2010): 1-384.
- Song B. y Chen X. 2009. «Effect of *Aeolosoma hemprichi* on excess activated sludge reduction.» *Journal of Hazardous Materials* 162 (1): 300-304.
- Sterken M.G., Snoek L.B., Kammenga J.E. y Andersen E.C. 2015. «The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*.» *Trends in Genetics* 31 (5): 224-31.
- Stumm W. y Morgan J.J. 1981. «Aquatic chemistry an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. » *Wiley, NY*: 176-177.
- Tamis J., Van Schouwenburg G., Kleerebezem R. y Van Loosdrecht M.C.M. 2011. «A full scale worm reactor for efficient sludge reduction by predation in a wastewater treatment plant.» *Water Research* 45 (18): 5916-24.
- Tanaka T., Ikita K., Ashida T., Motoyama Y., Yamaguchi Y. y Satouchi K. 1996. «Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*.» *Lipids* 31 (11): 1173-78.

- Téllez J., Rodríguez A. y Fajardo A. 2006. «Contaminación por Monóxido de Carbono: un Problema de Salud Ambiental Ensayo/Essay.» *Rev. salud pública* 8 (1): 108-17.
- Tessier G. 1942. «Croissance des populations bactériennes et quantité d'aliment disponible. » *Review Science extrait du* nº 3208: 209–214.
- Wadsworth W.G. y Riddle D.L. 1989. «Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*.» *Developmental Biology* 132 (1): 167-73.
- Wallis J.G., Watts J.L. y Browse J. 2002. «Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next?.» *Trends in Biochemical Sciences* 27 (9): 467-473.
- Watts J.L. y Browse J. 2002. «Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 5854-59.
- Webb, J.L. y Chu F.L.E., 1982. «Phytoplankton as a food for bivalve larvae. » En: *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Pruder G.D., Langdon C.J. y Conklin D.E. (Eds.). Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA: 272–291.
- Wei Y., Van Houten R.T., Borger A.R., Eikelboom D.H. y Fan Y. 2003. «Comparison performances of membrane bioreactor and conventional activated sludge processes on sludge reduction induced by Oligochaete.» *Environmental Science and Technology* 37 (14): 3171-80.
- Wei Y., Wang Y., Guo X. y Liu J. 2009. «Sludge reduction potential of the activated sludge process by integrating an oligochaete reactor.» *Journal of Hazardous Materials* 163 (1): 87-91.
- Witting M. y Schmitt-Kopplin P. 2016. «The *Caenorhabditis elegans* lipidome: A primer for lipid analysis in *Caenorhabditis elegans*.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 589: 27-37.
- Wright DJ. 1975a. «ELIMINATION OF NITROGENOUS COMPOUNDS BY PANAGRELLUS REDIVIVUS, GOODEY, 1945» *Comparative Biochemistry and Physiology* 52B: 247-253.
- Wright D.J. 1975b. «Studies on nitrogen catabolism in *Panagrellus redivivus*, Goodey, 1945 (Nematoda: *Cephalobidae*).» *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and* 52 (2): 255-60.

- Yasui H., Nakamura K., Sakuma S., Iwasaki M. y Sakai Y. 1996. «A full-scale operation of a novel activated sludge process without excess sludge production.» *Water Science and Technology* 34 (3-4): 395-404.
- Yen K., Le T.T., Bansal A., Narasimhan S.D., Cheng J.X. y Tissenbaum H.A. 2010. «A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods.» *PLoS ONE* 5 (9): 1-10.
- Zhang J., Bakheet R., Parhar R.S., Huang C.H., Hussain M.M., Pan X., Siddiqui S.S. y Hashmi S. 2011. «Regulation of fat storage and reproduction by Krüppel-like transcription factor KLF3 and fat-associated genes in *Caenorhabditis elegans*.» *Journal of Molecular Biology* 411 (3): 537-53.
- Zhen G., Lu X., Li Y.Y., y Zhao Y. 2014. «Combined electrical-alkali pretreatment to increase the anaerobic hydrolysis rate of waste activated sludge during anaerobic digestion.» *Applied Energy* 128: 93-102.

RECURSOS ELECTRÓNICOS:

- > CGC: <http://www.cgc.cbs.umn.edu/> (CGC, 2017)
- > Eur-lex: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html> (Eur-lex, 2017)
- > Eurostat: <http://ec.europa.eu/eurostat> (Eurostat, 2017)
- > MAPAMA: <http://www.mapama.gob.es/> (MAPAMA, 2017)
- > OPEC: http://www.opec.org/opec_web/en/data_graphs/40.html (OPEC, 2017)
- > Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Pubmed, 2017)
- > Wormatlas: <http://wormatlas.org/> (WormAtlas, 2017)
- > Wormbase: <http://www.wormbase.org/> (WormBase, 2017)
- > Wormbook: <http://www.wormbook.org/> (Wormbook, 2017)

Las palabras de este último párrafo serán fruto de un intento de reflejar lo importantes que habéis sido en este largo camino recorrido; sin embargo, muy a mi pesar, soy consciente de que ni con la elección de los mejores versos sería capaz de transmitir que este trabajo no es mío; es nuestro. De hecho, no me aventuraré a personalizar los agradecimientos para evitar caer en la injusticia del olvido de alguno de los autores. Aunque, como no podía ser de otra manera, me tenéis que permitir algunas excepciones.

A vosotros, *directores*, porque esta tesis no sería una realidad sin vuestro compromiso personal y profesional. Y, sin duda, hubiera sido mucho más aburrida sin los grandes momentos que hemos compartido como amigos.

A ti, por acercarme a la ingeniería, por tu constancia, por tu sinceridad, por tu predisposición al trabajo, por mostrar que a veces solo hay un camino, por el arte de negociar y por tu ayuda siempre brindada. Gracias.

A ti, por presentarme al gusano, por tu entusiasmo, por tu inagotable energía positiva, por tu brillantez, por tus ideas descabelladas, por convertir el trabajo en una diversión y por creer en este proyecto tanto como en mí. Gracias.

Agradecimientos para el personal de EMASESA, por las muestras proporcionadas y el excelente trato personal recibido.

También, agradecer a BEFESA S.L por la financiación y colaboración aportada durante el inicio de este proyecto.

A todos los compañeros del CABD y del 47, a los que he tenido la suerte de conocer y a los que, con un simple saludo, hacen los días más agradables. También a los técnicos y la gente de servicios comunes por facilitarnos las labores rutinarias.

A *mi familia*, siempre presente, nunca falláis, hubierais escrito esta tesis con vuestras propias manos si os lo hubiera pedido. Ejemplo de humildad y sencillez; simplemente soy lo que soy porque vosotros sois como sois. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

Qué decir de ti, con una simple sonrisa eres capaz de tornar una semana gris en un soleado fin de semana. No hay mejor compañera de viaje. Sencillamente, gracias por tu alegría.

Finalmente, agradecer enérgicamente a todas las personas que, desde el desconocimiento, habéis realizado vuestra aportación diaria a este proyecto.

